

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. Thomas Kirchner

miRNA-34, -192 und -215 sind potentielle prädiktive Biomarker für  
die Effektivität von Chemotherapie beim metastasierten kolorektalen  
Karzinom

**Dissertation**  
**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**  
**an der Medizinischen Fakultät der**  
**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von  
Giovanna Aurelia Heinemann

aus  
München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. Andreas Jung
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Andreas Herbst Professor Dr. Gerhard Scherer Professor Dr. Peter Bartenstein
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	-
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	16.03.2017

Ich widme diese Arbeit meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Das metastasierte kolorektale Karzinom (mKrk).....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Schlechte Prognose des metastasierten KKR, Stadium IV.....	1
<b>2. Therapie des mKrk.....</b>	<b>3</b>
2.1 Aktuelle Therapieoptionen in der Erstlinientherapie des mKrk.....	3
2.2 Der Vorteil einer Therapie mit Biomarkern .....	4
2.3 Die Erstlinientherapie - entscheidend für die Prognose .....	6
2.4 Steigerung der Effektivität von Chemotherapie mittels Biomarker .....	7
<b>3. Strategie für das Finden eines geeigneten Prädiktors .....</b>	<b>8</b>
3.1 Molekulare Wirkmechanismen der Chemotherapeutika .....	8
3.1.1 5- Fluor-Uracil (5-FU) und Folinsäure (Leucovorin).....	8
3.1.2 Oxaliplatin .....	10
3.1.3 Irinotecan.....	10
<b>4. Tumorbiologie .....</b>	<b>13</b>
4.1 Das Multi-step Modell der kolorektalen Karzinogenese .....	13
4.2 Das Tumorsuppressorgen p53 .....	13
4.3 p53 Mutationen.....	16
4.4 Das Potential von TP53 als Biomarker ist umstritten.....	16
4.5 Das TP53 Netzwerk.....	18
4.6 Interaktion zwischen p53 und Genen durch miRNA.....	21
<b>5. miRNA .....</b>	<b>22</b>
5.1 Einführung in die miRNA .....	22
5.2 Einfluss von miRNA auf die Tumorgenese.....	24
5.3 TP53 assoziierte miRNA .....	25
5.3.1 miRNA-221 .....	26
5.3.2 miRNA-215 .....	26
5.3.3 miRNA-192 .....	27
5.3.4 miRNA-22 .....	27
5.3.5 miRNA-223 .....	28
5.3.6 miRNA-34 .....	29
5.4 miRNA-22, -34, -192, -215 und -223 als prädiktive Biomarker .....	29

<b>6. Arbeitsmodell .....</b>	<b>31</b>
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
1. Untersuchungsmaterial .....	32
1.1 Therapieschema des FIRE-1 Studie .....	33
1.2 Klinisch- pathologische Charakterisierung des verwendeten FIRE-1 Patientenkollektivs .....	33
2. Methoden.....	34
2.1 Arbeitsplan – Methodik .....	34
2.2 RNA Extraktion.....	35
2.2.1 FFPE Gewebe.....	35
2.2.2 Mikrodissektion.....	35
2.2.3 RNA Isolation.....	35
2.3 Bestimmung des p53 Mutationsstatus .....	36
2.3.1 Immunhistochemie .....	37
2.4 Primeroptimierung für RT-qPCR .....	38
2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	39
2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.4.3 Konzentrationsverhältnis- Optimierung .....	42
2.5 Reinheitsmessung und Konzentrationsmessung im NanoDrop.....	43
2.6 miRNA Isolation.....	44
2.7 cDNA und ciDNA Synthese .....	44
2.7.1 Quantitative Realtime PCR .....	45
2.8 Referenzgen- $\beta$ -Actin .....	46
2.9 Statistische Analyse .....	47
<b>III. Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>1. Prüfung experimenteller Voraussetzungen .....</b>	<b>48</b>
1.1 Das gewählte Patientenkollektiv ist repräsentativ für die gesamte Intent-to-treat-Population der FIRE-1 Studie.....	48
1.2 Immunhistochemische Expression von p53 korrelierte mit dem Vorliegen von Mutationen ( <i>Next Generation Sequencing</i> ) .....	50
1.3 Ergebnisse der Primeroptimierung .....	51
<b>2. Kanzerogenese und Tumorbiologie .....</b>	<b>52</b>
2.1 miRNA-192 und -215 finden sich in p53 mutierten Tumorproben niedriger exprimiert	53
2.2 Korrelation von miRNA mit möglichen Zielgenen .....	54
<b>3. Prädiktive Faktoren für Chemotherapie Effektivität.....</b>	<b>55</b>

3.1 p53 Genmutation oder TP53 Überexpression korrelieren nicht mit den Effektivitätsparametern für Chemotherapie .....	55
3.2 miRNA Expressionswerte korrelieren mit Therapieansprechen .....	56
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>61</b>
1. Qualitätssicherung .....	62
2. p53 Mutationsanalyse: NGS Daten zeigen einen Zusammenhang mit Ergebnissen der Immunhistochemie .....	62
3. p53 Mutation oder TP53 Überexpression zeigten keinen Zusammenhang mit Ansprechen auf Chemotherapie.....	63
4. TP53 regulierte mRNA.....	64
5. Modell des p53 Netzwerkes .....	65
6. Starke Tumorsuppressor-miRNA Expression korreliert mit Chemoresistenz.....	68
6.1 Niedrige miRNA-34 Expression ist mit hohen Effektivitätsparametern bei mIROX Therapie assoziiert.....	69
6.2 Niedrige miRNA-192 Spiegel sind mit deutlich höheren Ansprechraten assoziiert .....	70
6.3 Niedrige Mengen an miRNA-215 sind mit guten Ansprechraten bei FUFIRI Therapie assoziiert.....	70
7. miRNA beeinflussen Chemoresistenz durch Interaktion mit ihren Zielgenen.....	71
7.1 Positive Chemotherapieeffekte sind mit dem Zustand einer proliferierenden Zellen mit intaktem Zellzyklus assoziiert .....	72
7.2 Zellzyklusinhibitoren sind mit schlechteren Ansprechraten assoziiert .....	72
7.3 Chemosensitivität durch Proliferationsförderung z.B. mittels IGF1R .....	73
8. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	73
9. Schlussfolgerung und Ausblick .....	74
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>V. Literaturverzeichnis: .....</b>	<b>78</b>
<b>VI. Abbildungsverzeichnis: .....</b>	<b>82</b>
<b>VII. Tabellenverzeichnis: .....</b>	<b>82</b>
<b>VIII. Diagrammverzeichnis: .....</b>	<b>84</b>

# **I. Einleitung**

Tumorerkrankungen stellen in Deutschland nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Das bessere Verständnis der Tumorbiologie ermöglicht eine immer effektivere Therapie nicht nur mit Chemotherapeutika, sondern auch mit biologisch gezielten Substanzen und in zunehmendem Maße auch mit Immuntherapeutika. Da die Erstlinientherapie, also der erste therapeutische Behandlungsversuch, entscheidend für die Remission eines Tumors ist, sind Biomarker, welche den Erfolg der Behandlung prädictieren, erforderlich. Der Einsatz geeigneter Biomarker zur Identifizierung einer Subpopulation von Patienten, die besonders von einer bestimmten Therapie profitieren, ist somit sowohl für die Behandlung der Patienten an sich, aber auch aus sozioökonomischer Sicht relevant.

## **1. Das metastasierte kolorektale Karzinom (mKRR)**

### **1.1 Epidemiologie**

In Deutschland stellt das KRR unter den soliden Tumoren die zweithäufigste Todesursache dar. Pro Jahr werden 65.000 Neuerkrankungen registriert und 25.000 Menschen sterben jährlich an den Folgen dieser Krankheit[1]. Das Risiko an einem KRR zu erkranken ist altersabhängig und betrifft meistens Patienten jenseits des 50. Lebensjahres. Männer erkranken tendenziell häufiger als Frauen, das mittlere Erkrankungsalter ist mit 70 Jahren jedoch geschlechtsunabhängig. Das Lebenszeitrisko, an einem KRR zu erkranken, beträgt in Deutschland ca. 5%. Im Vordergrund der aktuellen Bemühungen steht einerseits der Versuch, die Inzidenz der KRR-Erkrankungen durch Vorbeugung und Screening-Maßnahmen zu reduzieren. Weiterhin helfen moderne therapeutische Strategien, das Überleben bei metastasierter Erkrankung zu verlängern.

### **1.2 Schlechte Prognose des metastasierten KRR, Stadium IV**

Die Prognose der Erkrankung bemisst sich am UICC-Stadium, (Unio internationalis contra cancrum, dt.: Internationale Vereinigung gegen Krebs) welches im Wesentlichen durch die TNM (Tumor, Nodal-Status, Metastase)-Klassifikation definiert ist [2]. Während in den Stadien

UICC I und UICC II noch von einer guten Prognose mit hohen Heilungswahrscheinlichkeiten auszugehen ist, so ist die Prognose in den fortgeschrittenen Erkrankungsstadien UICCIII und UICCIV deutlich schlechter. Die 5- Jahres- Überlebenswahrscheinlichkeit liegt im Stadium III noch bei 40-88 % [3]. In Stadium IV, welches durch das Vorliegen einer Fernmetastasierung definiert ist, liegt diese jedoch bei nur 8%. Patienten in diesem Stadium gelten, wenn keine primär resezierbaren Metastasen vorliegen, als unheilbar. Durch den Prozess der Metastasierung ist demnach ein deutlicher Abfall der Überlebensraten festzustellen. (Abb.1).

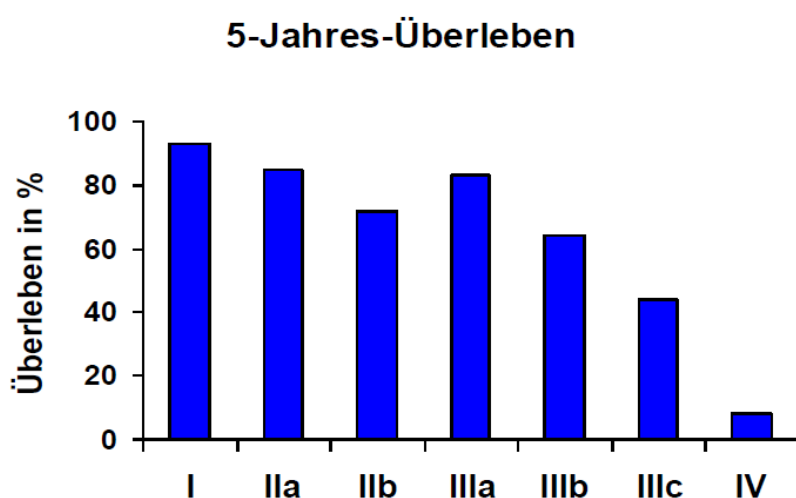


Abbildung 1: 5-Jahres Überleben in Abhängigkeit des Tumorstadiums nach UICC Klassifikation ([4])

Dieser Zusammenhang ist sehr wichtig, wenn man bedenkt, in welchem Stadium die Krankheit erstmals diagnostiziert wird. Mangelnde Vorsorgeuntersuchungen und eine schlechte Akzeptanz von Koloskopien sind oft Gründe für die Diagnose bereits weit fortgeschrittener Tumoren. Während die überwiegende Mehrheit aller Erkrankten bei Diagnosestellung ein lokalisiertes Stadium des KRK (UICC-Stadium I–III) aufweist, so liegt bei etwa 20–25 Prozent der KRK-Patienten bereits zu diesem Zeitpunkt eine Fernmetastasierung vor (synchrone Metastasierung). Dabei ist ferner zu beachten, dass weitere 25 Prozent der initial in kurativer Intention behandelten Patienten im späteren Verlauf eine Metastasierung entwickeln (metachrone Metastasierung) [5]. Insgesamt wird also bei etwa der Hälfte der kolorektalen Tumoren im Krankheitsverlauf eine Metastasierung festgestellt. Zusammenfassend bedeutet dies, dass weiterhin eine große Gruppe an Patienten mit einer Metastasierung des KRK und folglich mit einer schlechten Prognose konfrontiert ist.



## 2. Therapie des mKRR

### 2.1 Aktuelle Therapieoptionen in der Erstlinientherapie des mKRR

Die Behandlung des mKRR kann potenziell kurativ oder palliativ sein. Ersteres bezieht sich auf die Patientengruppe mit primär oder potenziell resezierbaren Metastasen. Eine palliative Therapie des mKRR kommt dann zum Einsatz, wenn entweder eine lokoregionäre Intervention in kurativer Absicht technisch nicht möglich ist, oder wenn Patienten auf Grund ihres klinischen Zustandes oder ihrer Komorbiditäten als nicht operabel eingeschätzt werden. Im Vordergrund der palliativen Behandlung steht die systemische Chemotherapie. Chirurgische oder lokal ablativ Verfahren werden nur in das Behandlungskonzept miteinbezogen, wenn tumorbedingte Symptome verhindert oder behandelt werden sollen.

In der Erstlinienbehandlung des metastasierten Stadiums besteht das Hauptziel der Chemotherapie vorrangig darin, möglichst hohe Remissionsraten (ORR, *overall response rate*) und lange progressionsfreie Zeiten (PFS) zu erzielen, um das Gesamtüberleben (OS) zu steigern. Die besten therapeutischen Erfolge werden durch den Einsatz von Kombinations-Chemotherapien erzielt. Denn die Methode Zytostatika nicht als Monotherapien, sondern immer in Kombination zu verabreichen, bietet einerseits mehrere Angriffspunkte zur Tumorelimination, reduziert andererseits deren Toxizität und mögliche Nebenwirkungen, da die jeweiligen Substanzen deutlich niedriger dosiert werden können als bei Einzelgabe [6].

Im Spektrum der Chemotherapie des mKRR befinden sich aktuell hauptsächlich vier Wirkstoffe. Diese sind die beiden Fluoropyrimidine 5-Fluorouracil und seine Vorstufe Capecitabine, sowie der DNA-Topoisomerase II Inhibitor Irinotecan und das cis-Platinderivat Oxaliplatin. Zu den am häufigsten angewendeten Kombinationsregimen gehören FOLFIRI (Folinsäure/ 5-FU + Irinotecan), CAPIRI (Capecitabine + Irinotecan) und FUFIRI (5-Fluorouracil/ Folinsäure + Irinotecan). Letzteres ist eine vor allem in Deutschland angewandte Variante des ersteren. Weiter sind FOLFOX (Folinsäure/ 5-FU + Oxaliplatin), CAPOX (Capecitabine + Oxaliplatin) und seltener auch IROX (Irinotecan und Oxaliplatin) in Anwendung.

Die systemische Therapie wurde neben der Chemotherapie in den letzten Jahren um zielgerichtete Antikörpertherapie und kürzlich um die Immuntherapie erweitert. So hemmen beispielsweise die monoklonalen Antikörper (MABs) Cetuximab und Panitumumab den EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), eine Rezeptor- Tyrosinkinase, welche

Proliferation, Angiogenese, Migration und Metastasierung induziert und in den meisten KRK überexprimiert ist [7]. Der monoklonale Antikörper Bevacizumab hingegen reduziert die Neubildung von Gefäßen und damit Tumorwachstum indem es den VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Faktor A*) hemmt. Diese Therapieoptionen werden in den aktuellen S3-Leitlinien empfohlen [8].

Zusammenfassend gibt es somit ein breites Spektrum an Therapieoptionen und Angriffspunkten, um das Tumorwachstum zu unterbinden. Die Herausforderung besteht darin, für einen individuellen Patienten herauszufinden, welches die effektivste und verträglichste Therapie ist, also eine personalisierte Therapie. Die Lösung dieser Frage bieten prädiktive Biomarker, also Faktoren welche den Erfolg einer Therapie vorhersagen können. Für anti-EGFR zielgerichteten Antikörpertherapien gibt es solche Biomarker in Form des Mutationsstatus der RAS-Gene KRAS (*Kirstin Rat Sarcoma*) und NRAS (*neuronal RAS*) bereits. Daher sollen an deren Beispiel die Vorteile prädiktiver Biomarker dargestellt werden.

## 2.2 Der Vorteil einer Therapie mit Biomarkern

Prädiktive Biomarker sind Faktoren, welche schon vor Therapiebeginn eine Aussage bezüglich der mit dem Ansprechen verbundenen Parameter wie Responserate, progressionsfreies Überleben oder Gesamtüberleben ermöglichen.

Momentan verlieren Patienten wichtige Überlebenszeit, weil viel zu oft Chemotherapien eingesetzt werden, welche nur wenig Ansprechen und damit mäßigen Erfolg der Therapie zeigen. Diese Erkenntnis ergibt sich jedoch erst nach Beendigung der Therapie. Der Vorteil eines prädiktiven Biomarkers wird am Beispiel der RAS Gene KRAS und NRAS deutlich. Denn durch diese wurde die zielgerichtete Therapie revolutioniert. Während Chemotherapeutika, sowie auch die anti-angiogen wirkenden Substanzen Bevacizumab, Afibercept und Regorafenib derzeit unselektiert, d.h. ohne verfügbaren Biomarker, bei allen Patienten mit mKRK eingesetzt werden können, haben sich Mutationen der RAS-Gene KRAS und NRAS als negative Prädiktoren für Therapien mit anti-EGFR-Antikörpern wie Cetuximab oder Panitumumab etabliert. Nur bei Tumoren mit RAS-Wildtyp-Sequenz (WT) dürfen Cetuximab oder Panitumumab eingesetzt werden, da KRK mit mutierten RAS-Genen kein Ansprechen auf eine anti-EGFR zielgerichtete Therapie zeigen oder sogar durch diese geschädigt werden, was in klinischen Studien (CRYTSAL, PRIME u.a.m.) [9] gezeigt werden konnte. Die Gruppe der RAS-WT Patienten macht in etwa 50% aller Patienten mit mKRK

aus. So wurde in der CRYSTAL Studie der Vergleich von Chemotherapie, in diesem Fall FOLFIRI, gegenüber einer Gruppe mit FOLFIRI und Cetuximab getestet. Hier wurde gezeigt, dass die Kombination aus Polychemotherapie und Antikörpertherapie einer alleinigen Polychemotherapie überlegen ist, jedoch ausschließlich für RAS WT Patienten. RAS mutierte Patienten zeigten keinen Nachteil durch die zusätzliche Antikörpertherapie, RAS WT Patienten hatten jedoch mit 28,4 Monaten (WT) vs. 22,2 Monaten (MUT) einen deutlichen Überlebensvorteil [9].

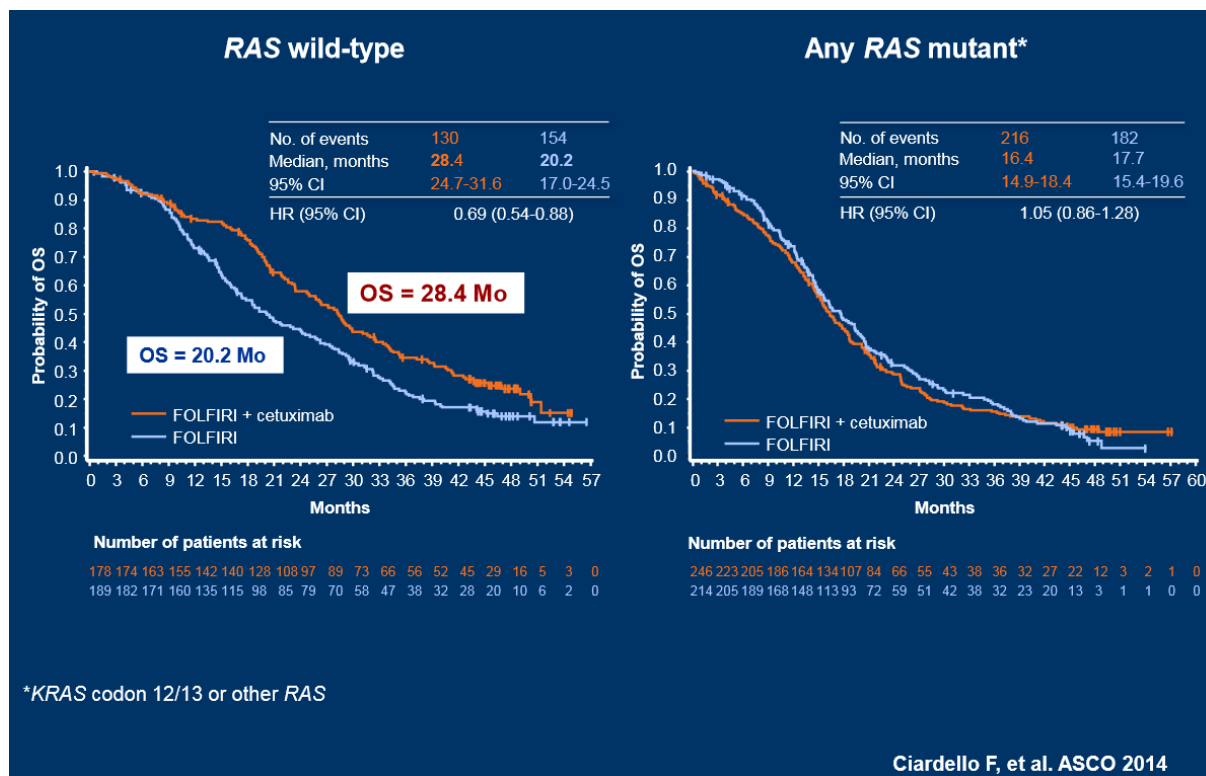


Abbildung 2: Ergebnisse der CRYSTAL Studie von Ciardiello F et. al. [10]

Auch die PRIME Studie, welche das Ansprechen von mKRK auf FOLFOX ohne oder mit Zusatz von anti-EGFR zielgerichtetem Panitumumab (Pmab) untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass nur RAS WT Patienten von einer anti-EGFR Therapie profitieren (OS, RAS WT, FOLFOX-Pmab: **23,9 m**, FOLFOX: **19,7 m**). Zusätzlich zeigten sich im Unterschied zur CRYSTAL Studie, dass RAS MUT Patienten sogar ein deutlich geringeres Überleben nach Therapie mit der Kombinationstherapie FOLFOX mit Panitumumab haben. (OS, RAS MUT, FOLFOX-PMab: **15,5m**, FOLFOX: **19,2m**) [11].

Zusammenfassend zeigten beide Studien den Vorteil einer anti-EGFR Therapie bei RAS WT. In diesen Studien fand somit eine Patientenselektion auf der Basis einer Genmutationsanalyse

als Biomarker statt. Diese bietet RAS WT Patienten einen Überlebensvorteil und bewahrt RAS mutierte Patienten vor schlechten Ansprechraten, Schädigung durch die Therapie oder einem Therapieversuch, welcher nicht der maximal möglichen Effektivität entspricht. Biomarker tragen somit zur Optimierung einer Therapie bei, indem diese zu besseren Ansprech- und Überlebensraten führen, was wiederum bedeutet, dass diese Patienten eine maximale Nutzung des Therapieeffektes erfahren. Einen möglichen Therapieerfolg präzisieren zu können, ist aus einem weiteren Grund wichtig. Denn es geht nicht nur darum, die Überlebenszeiten um ein paar Monate zu verlängern, sondern ineffektive, aber nebenwirkungsreiche Therapien zu vermeiden.

## 2.3 Die Erstlinientherapie - entscheidend für die Prognose

Die kritische Determinante für das Gesamtüberleben bei Einsatz einer adjuvanten Therapiestrategie ist die Erstlinientherapie [5]. Darunter versteht man die Erstanwendung einer (Kombinations-) Chemotherapie. Denn mit dem gewählten, ersten Therapieregime wird das Ausmaß von Ansprechrate, PFS und OS determiniert. Geringe Remissionsraten in der Erstlinientherapie können dabei nicht in Zweitlinien- oder Folgetherapien „aufgeholt“ werden. So zeigen Substanzen in Anwendung als Zweitlinien Therapeutika deutlich schlechtere Remissionsraten, als nach ihrer Anwendung in der Erstlinientherapie. In einem zweiten Therapieregime halbieren sich sowohl Ansprechrate, als auch progressionsfreie Zeit (Tab.1).

Parameter	Erstlinientherapie	Zweitlinientherapie	Folgelinientherapie
Ansprechrate	38-64% [12],[13]	10-35 % [14]	1-13% [15]
Progressionsfreie Zeit	8-11 Monate [16]	4-7 Monate [17]	2-3 Monate [18]

Tabelle 1: Ansprechraten und PFS je nach Therapielinie

Die mechanistische Erklärung dieses Sachverhaltes ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. Die Bildung von Resistenzmechanismen und Änderungen der Tumorbiologie im Therapieverlauf, spielen in jedem Fall eine wichtige Rolle. So zeigten Oxaliplatin-resistente kultivierte kolorektale Zelllinien ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber 5-FU und umgekehrt 5-FU resistente Zelllinien eine Kreuzresistenz gegenüber Oxaliplatin [19]. Diese

Resultate lassen annehmen, dass die Resistenzbildung gegenüber einem Therapeutikum eine generelle Resistenzbildung für viele Chemotherapeutika induziert.

Zusammenfassend ist somit die richtige Wahl einer (Kombinations-) Chemotherapie in der Erstlinientherapie entscheidend für das Erreichen eines maximalen Gesamtüberlebens, da der Effekt der Erstlinientherapie nicht mehr aufgeholt werden kann. Dies schließt wiederum den Bogen zu den Biomarkern, die die Wahl dieser bestimmen helfen könnten, im klinischen Alltag für die Wahl einer geeigneten Chemotherapie jedoch fehlen.

Das Fehlen eines Biomarkers für die palliative Chemotherapie des mKRK ist die Ausgangslage und zugleich Zielstellung dieser Arbeit, die in der Entwicklung einer Strategie besteht, prädiktive Biomarker für die Chemotherapie des mKRK zu bestimmen.

## **2.4 Steigerung der Effektivität von Chemotherapie mittels Biomarker**

Nachdem die Vorteile eines Biomarkers für Therapieansprechen am Beispiel von anti-EGFR Therapien verdeutlicht wurden, zeigt sich immer mehr, dass für die Wahl einer effizienten Erstlinien (Kombinations-) Chemotherapie prädiktive Biomarker fehlen. So liegt die jährliche Letalität von KRK- Patienten trotz der Einführung von (Kombinations-) Chemotherapie und fortlaufend neuer, optimierter Behandlungsstrategien, bei etwa 30.000. Es fehlt also ein verlässlicher Biomarker, welcher hohe Ansprechraten garantiert, einen Therapieerfolg prädiziert und folglich Fehlversuche vermindern könnte.

Derzeit wird Patienten mit RAS WT in der Erstlinientherapie eine Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab oder Panitumumab empfohlen. Als Chemotherapie-Backbone wird präferenziell FOLFIRI empfohlen, da Oxaliplatin negative Interaktionen mit dem EGF-Rezeptor zeigt [20]. Bei erhöhten Bilirubin Werten sollte hingegen FOLFOX eingesetzt werden [21]. Bei RAS-mutierten Patienten, wird eine Chemotherapie mit FOLFIRI oder sogar besser mit FOLFOXIRI (plus Bevacizumab) empfohlen [22]. Durch einen Prädiktor für Chemotherapie würden somit beide RAS-Gruppen profitieren. Dadurch würden RAS WT Patienten noch länger überleben und RAS mutierte Patienten endlich einen Vorteil durch

Prädiktionsmöglichkeiten erfahren [23], denn für diese Gruppe besteht derzeit keine rational basierte Möglichkeit der Auswahl einer Chemotherapie.

### 3. Strategie für das Finden eines geeigneten Prädiktors

Grundsätzlich bestehen zwei Ansatzmöglichkeiten, prädiktive Biomarker aufzufinden. In einem statistisch-assoziativen Ansatz wird eine Vielzahl von Markern bestimmt und mit dem Überleben verschiedener Patienten-Subgruppen verglichen. Für diesen Ansatz wird grundsätzlich eine große Stichprobe, d.h. eine Vielzahl an Patienten benötigt, die oft nicht zur Verfügung stehen. Alternativ kann man versuchen, die Zusammenhänge der Resistenz zu verstehen und durch einen deduktiven Ansatz molekulare Mechanismen modellieren, die Hinweise auf geeignete Biomarker liefern. Für diesen Ansatz werden deutlich weniger Patienten benötigt, jedoch muss dazu ein Modell erarbeitet werden.

In dieser Arbeit wird der deduktive Ansatz verfolgt. Dazu werden im Folgenden die notwendigen Elemente der Induktionsbasis vorgestellt. Auf dieser Basis wird ein Arbeitsmodell entwickelt, aus dem sich die relevanten Faktoren und damit die Arbeitshypothese ableiten lassen.

#### 3.1 Molekulare Wirkmechanismen der Chemotherapeutika

Im Folgenden werden die für die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzten Wirkstoffe nach ihrer molekularbiologischen Wirkung, sowie ihre Haupt- und Nebeneffekte beschrieben.

##### 3.1.1 5- Fluor-Uracil (5-FU) und Folinsäure (Leucovorin)

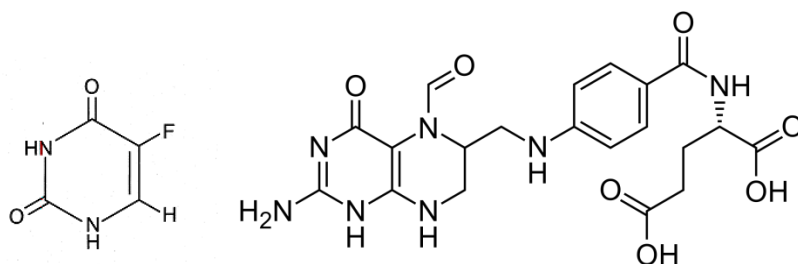


Abbildung 3: 5-FU ( $C_4H_3FN_2O_2$ ) und Folinsäure ( $C_{20}H_{23}N_7O_7$ )

5-FU und Folinsäure (Abb.3) gehören als Kombination (Folinic Acid (FA)/ Leucovorin (LV)) zu den Chemotherapeutika erster Wahl des metastasierten kolorektalen Karzinoms [8].

Die kombinierte Verabreichung beider Substanzen stützt sich auf eine Vielzahl klinischer Studien. In einer Metaanalyse mit 3300 Patienten [24] zeigte sich eine deutliche Überlegenheit von 5FU+FA gegenüber einer 5-FU Monotherapie hinsichtlich der Ansprechraten (RR, 5-FU: 11%; 5-FU mit FA: 21%; CI: 0,44- 0,63;  $p < 0,0001$  und des Gesamtüberlebens (OS, 5-FU: 11,7; 5-FU mit FA: 10,5 Monate; CI: 0,87- 0,94;  $p < 0,004$ ).

5-FU wirkt erst nach Umwandlung in die aktiven Metaboliten 5-Fluor-Uridin-Tri-Phosphat (FUTP) und 5- Fluor-Desoxy-Uridin-Mono-Phosphat (FdUMP). Dabei blockiert FdUMP die DNA- Synthese, indem es die Thymidilat- Synthetase (TS) hemmt. Dies führt zur Erschöpfung der dTTP Reserven und zu Instabilitäten im Desoxy-Ribonukleotid-Pool. Vor allem ein gestörtes Verhältnis von dATP zu dTTP führt zu Störungen der DNA- Synthese und Reparatur. Weiter kann FdUMP nach Phosphorylierung zu FUTP und Einbau in die DNA zu Strangbrüchen führen. Wenn FUTP in RNA eingebaut wird, kann es zur Termination der Transkription kommen. Diese Effekte zeigen sich vor allem in Zellen mit hoher Teilungsrate, da in diesen Zellen die 5-FU Aufnahme durch erhöhte Teilungsraten und Nukleotid-Umsatz erhöht ist. Folglich zeigt sich die Wirkung vor allem in Tumorzellen aber als adverser Effekt auch in Wechselgeweben, wie den Schleimhautzellen des Verdauungstraktes, Haarzellen und Zellen des Knochenmarkes, was einen Teil der Nebenwirkungen der Therapie erklärt. Die toxischen Wirkungen äußern sich demnach als Fieber, Diarrhoe, Stomatitis, Mukositis, neurotoxische Symptome und Knochenmarkstoxizität mit Leukopenie oder Panzytopenie[25].

Folinsäure ist essentiell für die Purin- und Pyrimidin- Nukleotidsynthese, sowie den Metabolismus der Aminosäuren. Biochemische Grundlage für die Kombination von Folinsäure und 5- Fluorouracil in der Chemotherapie ist die Bildung eines stabilen Komplexes, bestehend aus der Thymidilat-Synthetase (Angriffspunkt des 5-FU), FdUMP (Metabolit des 5-FU) und 5,10-Methylen-Tetra-Hydrofolat. Daraus resultiert eine anhaltende Blockade der Thymidilat-Synthetase und in der Folge eine verstärkte Hemmung der DNA- Biosynthese [26]. Analog kommt es bei dieser Kombination erwartungsgemäß zu einer erhöhten Zytotoxizität und folglich Nebenwirkungen (s.o.).

Für den klinischen Einsatz von 5-FU ist die Dihydropyrimidin- Dehydrogenase (DPD) ein wichtiger prognostischer Faktor für die Verträglichkeit von 5-FU, da DPD am Abbau von 5-FU beteiligt ist. Niedrige Mengen an DPD in der Zelle führen demnach zu erhöhten 5- FU Spiegeln und folglich erhöhter Toxizität. Interessanterweise hängt die Expressionsmenge von DPD von einem Polymorphismus im Promotor/ Enhancer des DPD-Gens ab.

Dieser kann durch einen tumorgenetischen Test vor Therapiebeginn bestimmt werden. 50 % der Polymorphismen befinden sich dabei im Exon 14 ( IVS14+1G>A) [27]. So wird bei Vorliegen des Polymorphismus, der mit einer geringeren Expression des Proteins einhergeht, eine geringere Menge an 5- FU eingesetzt werden, um die Nebenwirkungen zu reduzieren [28].

### **3.1.2 Oxaliplatin**

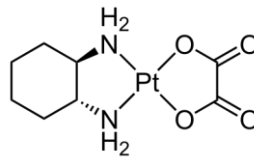


Abbildung 4: Oxaliplatin-Strukturformel

Oxaliplatin gehört zur Gruppe der cis-Platinderivate und kann durch Intra- und Interstrangvernetzungen, wie z.B. Thymidindimere zum Abbruch der DNA-Synthese führen. Dabei zeigt Oxaliplatin allein keine Wirkung auf mKRR, doch wirkt es synergistisch mit 5-FU. Der 1,2-Di-Amino-Cyclo-Hexyl- (DACH) -Ligand beeinflusst die Fähigkeit der Zelle, DNA-Platin-Addukte zu tolerieren. Die dosislimitierenden Nebenwirkungen von Oxaliplatin manifestieren sich in einer kumulativen Neurotoxizität, wie Parästhesien an den Extremitäten oder laryngo-pharyngealen Dysästhesien [29].

### **3.1.3 Irinotecan**

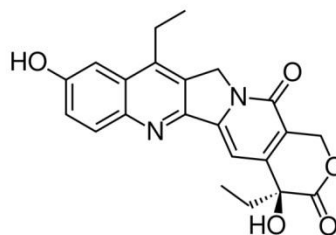


Abbildung 5: Irinotecan Strukturformel

Irinotecan (CPT-11) greift durch Hemmung der DNA-Topoisomerase-I in die DNA-Synthese und dadurch ebenfalls in den Zellzyklus ein. Es ist ein halbsynthetisches Camptothecin (CPT) Derivat und kann intrazellulär durch Carboxyl-Esterasen zu SN-38 metabolisiert werden, das



den aktiven Metaboliten darstellt. Eine Hemmung der DNA-Topoisomerase I durch SN- 38 führt zu Einzelstrangläsionen der DNA, welche in eine Blockade der DNA-Replikationsgabel münden und somit zytotoxisch wirken. Irinotecan wird in Kombination mit 5-FU/ FA, den biologisch aktiven anti-EGFR Antikörpern Cetuximab und Panitumumab oder dem anti-VEGF Antikörper Bevacizumab, sowohl in der Erstlinien- als auch Zweitlinientherapie eingesetzt oder in der Zweitlinie nach 5-FU Vortherapie [8].

Die UDP-Glucuronosyl-transferase 1A1 (UGT1A1) katalysiert in der Leber die Glucuronidierung von 7-Ethyl-10-Hydroxy-camptothecin (SN-38), dem aktiven Metaboliten von Irinotecan, der zu seiner funktionellen Inaktivierung führt. Es gibt bereits einen häufigen und gut beschriebenen Polymorphismus in der Promotorregion des Genes, welcher als UGT1A1\*28 bezeichnet wird [30]. Durch diesen wird die Verstoffwechslung von Irinotecan vermindert und folglich dessen toxische Wirkung erhöht [45]. Durch tumorgenetische Analysen von UGT1A1 vor Therapiebeginn, können inaktivierende Mutationen entdeckt werden, um durch Reduktion der Dosis von Irinotecan den toxischen Effekt zu kompensieren.

Zusammenfassend führen alle drei Chemotherapeutika, 5-FU/ FA, Oxaliplatin und Irinotecan zur Inhibition der DNA Synthese.

- 5-FU hemmt die Thymidilatsynthese und verhindert somit den Nachschub von Pyrimidinen, welche für die DNA Synthese nötig sind. Im Rahmen des Zellzyklus ist hier die Synthesephase (S- Phase) gestört, welches die weitere Proliferation der Zelle hemmt.
- Oxaliplatin führt zu DNA- Strangbrüchen, welche eine Reihe von Reparationsmechanismen in Gang setzt, welche die Proliferation der Zelle stoppen oder zu Apoptose führen. Die Schädigung erfolgt hierbei Phasen unabhängig.
- Irinotecan wiederum führt zur Hemmung der DNA- Synthese in der S- Phase, weil es die DNA- Topoisomerase I hemmt.

In der Folge kommt es zu Zellzyklusstörung und zu Apoptose. In der Regulation dieser beiden *hallmarks of cancer* [31] kann man somit potentielle Biomarker für die Prädiktion der Wirkung dieser Chemotherapeutika vermuten.

### **3.2 Molekulare Ziele von Chemotherapie: Apoptose und Zellzyklusstörung**

Da die drei beschriebenen Chemotherapeutika 5-FU/ FA, Oxaliplatin und Irinotecan über Apoptose oder über Einflussnahme auf den Zellzyklus wirken, kommt es zur Tumorreduktion. Für Apoptose ist dies offensichtlich, da durch Apoptose die Zahl maligner Zellen gesenkt und somit der Tumor im Wachstum gestoppt oder sogar in seiner Größe reduziert werden kann.

Der Effekt durch Zellzyklusstörung ist jedoch nicht so einfach zu verstehen. Denn eine Hemmung des Zellzyklus führt zu einem Proliferationsstopp. Dies erscheint auf den ersten Blick ein gewünschter Effekt zu sein, jedoch ist zu bedenken, dass für die Wirkung dieser Chemotherapeutika ein funktionierender Zyklus, also Regulation der Proliferation, Voraussetzung ist. Denn es ist bekannt, dass Zellen, die sich in der Ruhephase des Zellzyklus befinden (G<sub>0</sub>), durch Chemotherapeutika oder ionisierende Strahlen schlecht angreifbar sind. Speziell 5-FU/ FA und Irinotecan greifen in der S-Phase des Zellzyklus an. Da bei einer Chemotherapie nicht alle Zellen sterben, lässt sich schließen, dass durch einen Zellzyklusarrest eine Resistenz gegen Chemotherapie entstehen kann [32]. Andererseits verfügen viele bis alle Tumorzellen über keinen intakten Zellzyklus. Da sich in vielen Tumorzellen Mutationen in Regulatoren des Zellzyklus finden, läuft dieser im Unterschied zu normalen Zellen unkontrolliert bzw. unkontrollierbar ab. So werden durch die Mutationen z.B. Wachstumsfaktoren verstärkt exprimiert, welche den Zellzyklus antreiben. Vor allem sind jedoch die Zellzyklus-Checkpoints der G<sub>1</sub>→S und G<sub>2</sub>→M Phasen außer Funktion gesetzt. In der Folge kommt es zu einem Verlust des Reparatur gekoppelten Arrests im Zellzyklus [33].

## 4. Tumorbiologie

### 4.1 Das Multi-step Modell der kolorektalen Karzinogenese

90% aller kolorektalen Karzinome entwickeln sich sporadisch. Die verbleibenden 10% sind das Ergebnis autosomal dominanter Erbkrankheiten, wie die Familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) und das Lynch- Syndrom. Prägt sich das Lynch-Syndrom im Kolorektum aus, wird es auch als hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC) bezeichnet.

Die meisten (85%) aller KRK entwickeln sich über eine Adenom-Karzinom-Sequenz, welche durch konsequente Mutationsschritte definiert wird (Abb. 6). In den meisten Fällen erfolgen Mutationen zunächst im Tumorsuppressorgen APC (*adenomatous polyposis coli*)-Gen, das deshalb auch als der *gatekeeper* der kolorektalen Karzinogenese bezeichnet wird [34]. Dieser Mutation folgen weitere Mutationen im Onkogen KRAS und dem Tumorsuppressorgen p53 (Abb. 6) [35, 36]. Nach diesem Modell sind die Genmutationen Triggerpunkte der Karzinogenese, die die Progression der Tumoren antreiben.

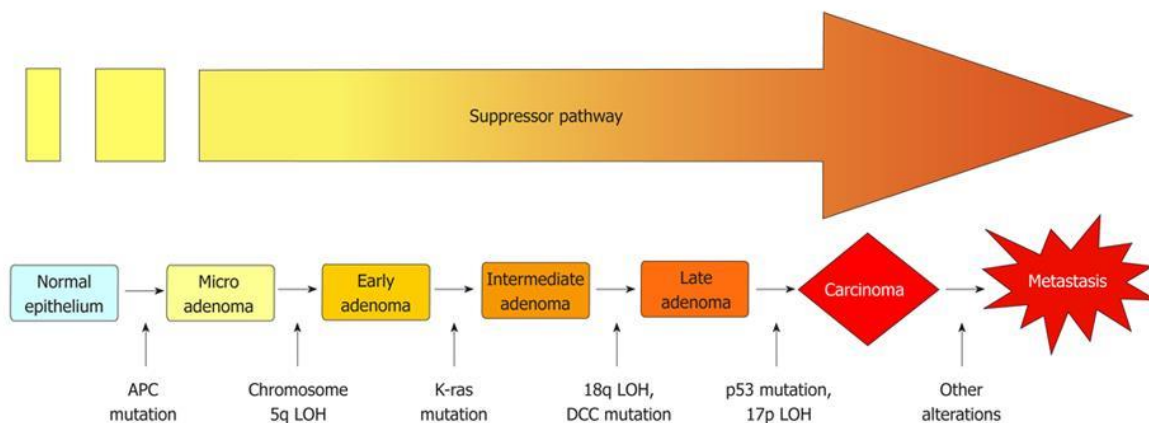


Abbildung 6: Adenom-Karzinom Sequenz nach dem Vogelstein- Modell [36]

Legende: APC (*adenomatous polyposis coli*), LOH (*loss of heterozygosity*) RAS: KRAS (*Kirsten Rat Sarcoma*), DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*)

### 4.2 Das Tumorsuppressorgen p53

Eine zentrale Rolle in der Regulation von Proliferation und Apoptose nimmt das Tumorsuppressorgen p53 (Protein: TP53) ein. p53 ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert und kodiert für den Transkriptionsfaktor TP53.

Keimbahnmutationen im p53-Gen sind als Li- Fraumeni Syndrom bekannt, das eine autosomal-rezessive Erbkrankheit darstellt. Menschen mit Li-Fraumeni-Syndrom haben eine im Vergleich zur Gesamtbevölkerung etwa 50-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit, ein Krebsleiden bis zum 30. Lebensjahr zu entwickeln [37]. Aufgrund dieser hohen Penetranz ergibt sich ein autosomal- dominanter Phänotyp dieser vererbten Erkrankung. Weiter wurde der p53 WT in der Rolle als Tumorsuppressor auch durch die Beobachtung bestätigt, dass Mäuse mit einem KO (*knock out*) des p53 Gens, also ohne funktionsfähiges TP53, sehr anfällig für sporadische Tumorentwicklungen waren [38].

Aufgrund seiner zentralen Rolle und Bedeutung ist der Wirkmechanismus von p53 sehr gut untersucht. TP53 ist ein Protein mit vielen Funktionen. Besonders wichtig ist die Rolle von TP53 als Transkriptionsfaktor. TP53 kontrolliert dadurch ein Netzwerk, das als Sensor für viele Krebs assoziierte Stresssignale wirkt. Zu diesen gehören DNA-Schädigungen, wie DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Verkürzungen der Telomere, Onkogenaktivierung, hyperaktive Zytokinausschüttung, Hypoxie u.a.m.[39]. Als Tumorsupressorgen im Zellzyklus hat TP53 eine Schlüsselfunktion in der Einleitung der Apoptose und der Inhibition der Zellproliferation, sodass es einen zentralen Regulationspunkt in den *Checkpoints* des Zellzyklus darstellt.

Bei DNA Schäden werden die Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM related*) und DNA-PK (Proteinkinase) aktiviert. Diese phosphorylieren TP53, wodurch es vor Ubiquitinylierung und in der Folge Abbau geschützt wird, indem durch die Phosphorylierung die Affinität des Proteins zu MDM2 (*minute double minute*) gesenkt wird. Phosphoryliertes TP53 kann so im Zellkern an die Enhancer-Bereiche seiner Zielgene, wie p21, BAX oder PUMA (*p53 upregulated mediator of apoptosis*), binden und deren Expression steigern und so den Zellzyklusarrest oder Apoptose der geschädigten Zelle einleiten. Der G<sub>1</sub> → S Phasen Arrest wird dabei vor allem durch p21, einem Inhibitor der Zyklin abhängigen Kinasen (CDK4/6, *cyclin dependent kinase*) vermittelt (Abb.2). In der Regulation der Apoptose nimmt PUMA eine bedeutende Stellung ein, indem es den Schalter zwischen Zellzyklusarrest (p21) und Apoptose (Bax) reguliert.

Bei der Reparatur der DNA reguliert TP53 seinen eigenen Abbau, indem das TP53-Zielgen MDM2, eine Ubiquitin-Ligase, hochreguliert wird. Ohne DNA-Schädigungen werden ATM und ATR weniger stark aktiviert und in der Folge sinkt die Phosphorylierung von TP53, sodass es zur Bindung von TP53 an MDM2 kommen kann. In der Folge kommt es zur Ubiquitinylierung des Carboxyterminus von TP53, was zu seinem Abbau führt.

Weiterhin fördert MDM2 den nukleären Export von TP53, wodurch seine transkriptionelle Aktivität reduziert wird. In der Summe sinkt auf diese Weise der TP53 Spiegel und in der Folge die Expression von MDM2 (Abb.7), sodass eine kleine Menge an TP53 in der Zelle verfügbar bleibt, die als Stresssensor fungiert. Dadurch kann eine Zelle im Falle von DNA Schädigungen schnell in den Zellzyklusarrest eintreten. Auf diese Weise wird verhindert, dass die durch die Schädigungen verursachten Fehler in der DNA durch Replikation in der S-Phase des Zellzyklus vermehrt werden.

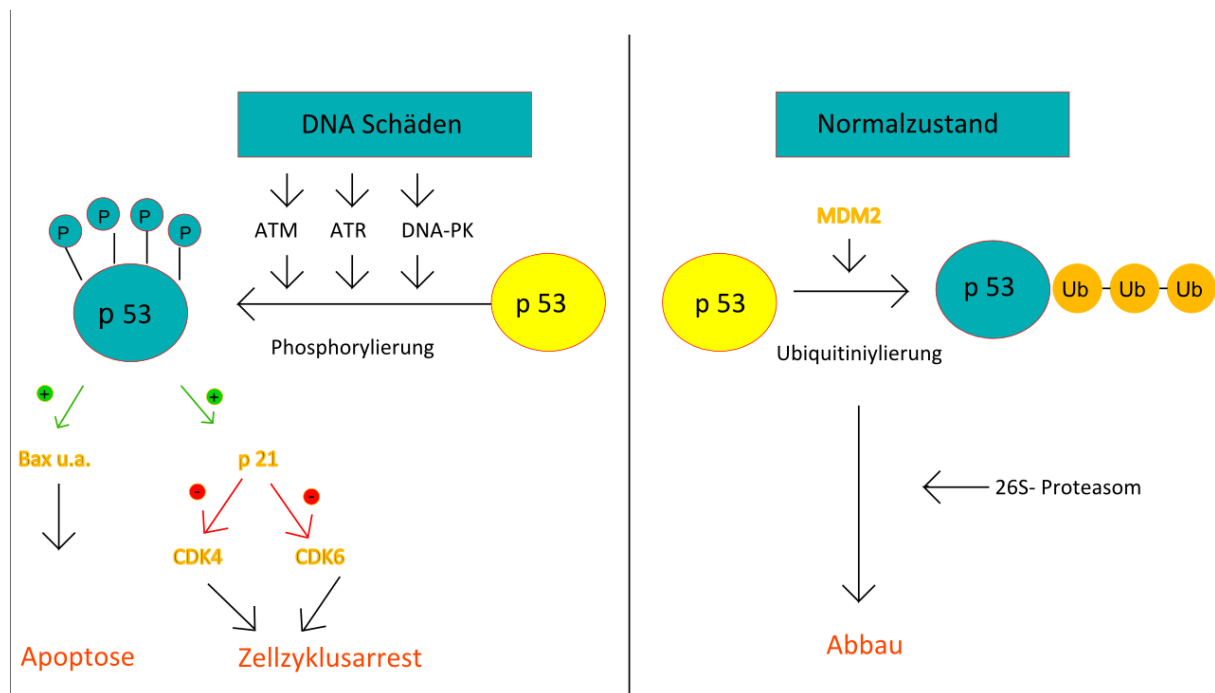


Abbildung 7: Regulation und Wirkmechanismus von TP53

In der Summe reguliert TP53 den Erhalt gesunder Zellen, weshalb es auch als *the guardian of DNA* bezeichnet wird. Kommt es durch Mutation des TP53 Gens im Rahmen der Kanzerogenese zum Ausfall seiner Funktion, resultiert dies in einer Störung der empfindlichen Homöostase der Zelle, insbesondere der Aufrechterhaltung der Integrität der DNA.

### 4.3 p53 Mutationen

Mutationen im p53-Genlokus sind die am häufigsten gefundenen genetischen Veränderungen im menschlichen Organismus [34]. Sie existieren bei verschiedenen Typen menschlicher Tumoren. Die Mehrheit bilden dabei *missense* Punktmutationen, vor allem von C~G in T~A Transitionen, was im Falle einer nicht synonymen Mutation zu einem den Einbau einer anderen Aminosäure führt. Die meisten funktionell relevanten Mutationen im p53 Gen kodieren die DNA Bindedomäne des TP53 Proteins, [40] sodass die Regulation der TP53 Zielgene und in der Folge die Aufrechterhaltung der Integrität der DNA zerstört werden. In der Folge sind betroffene Zellen nicht mehr in der Lage, ihre DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren, in den Zellzyklusarrest zu gehen oder Apoptose suszeptibel zu sein. Folglich können sich im Laufe von nachfolgenden Zellzyklen genetische Schäden anreichern, welche letztlich zur Entstehung von hochproliferativen Tumoren beitragen. Für das kolorektale Karzinom sind p53 Mutationen in 50-75% der Fälle beschrieben [36], die zu einem Verlust oder einer Fehlfunktion des TP53-Proteins führen.

### 4.4 Das Potential von TP53 als Biomarker ist umstritten

Es ergibt sich die Frage, ob der hochproliferative Zustand, welcher durch p53 Mutationen möglich wird, das Ansprechen auf eine Chemotherapie begünstigt. In diesem Fall könnte der Mutationsnachweis von p53 selbst ein geeigneter prädiktiver Biomarker sein. Umgekehrt würde sich bei Tumoren mit p53 WT Konstellation die Frage stellen, ob TP53 durch seine Zellzyklus- arretierende Wirkung den Angriff von Zytostatika unterbindet, weil diese zum Teil phasenspezifisch wirken. So induziert 5-FU den Zelltod in der späten G<sub>1</sub> und S- Phase und erschwert gleichzeitig den Übergang der Zellen in die S-Phase. Da p53 WT die Zellen jedoch in der G<sub>1</sub> Phase blockiert, ist es fraglich, ob 5- FU dann noch effektiv wirken kann. Eine mögliche Hypothese wäre daher, dass 5- FU von einer p53 Mutation und somit einem unkontrollierten Zellzyklus profitieren könnte. Somit sollte eine 5- FU Therapie erfolgreicher sein, wenn p53 Mutationen vorhanden sind.

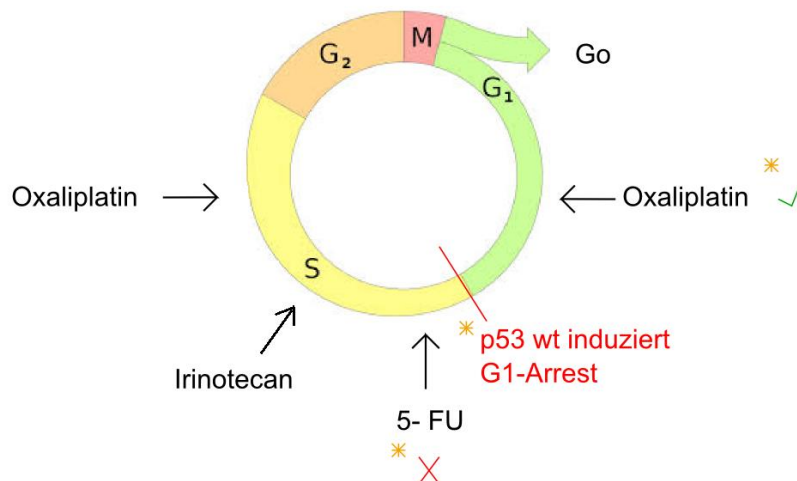


Abbildung 8: Angriffspunkte der Zytostatika im Zellzyklus und der Einfluss von p53

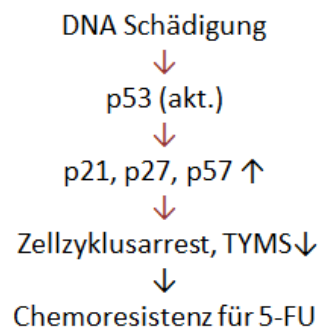


Abbildung 9: Möglicher Erwerb von Chemoresistenz von 5- FU bei p53 WT

Oxaliplatin führt zur Bindung und damit Schädigung von DNA durch Addukt-Bildung und Kreuzvernetzung. Besonders kritisch wirken sich derartige Mutationen in der S-Phase aus. Es ist vorstellbar, dass eine p53 wildtypische Zelle diese Schäden detektieren könnte, Reparatur einleitet und bei zu hohem genotoxischen Stress in die Apoptose läuft. In p53 mutierten Zellen, würden die Schäden nicht repariert werden, da es keinen G<sub>1</sub>→S Arrest gibt, sodass es in der S-Phase zu einer abortiven Replikation kommt, was zum Zelltod führt. Dieser Unterschied ist ein Wirkmechanismus, auf dem Chemotherapien als genotoxischer Stress wirken.

Zusammen genommen könnte der Mutationsstatus von p53 daher als Biomarker dienen. Eine Biomarkerfunktion des p53-Gens wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert [32, 41-43]. Die Meinungen teilen sich allein schon bei der Frage, ob eine Mutation positiv oder negativ prädiktiv für das Gesamtüberleben ist [43]. Defekte des p53 Gens gehen in einer Reihe von Tumormodellen mit einem schlechteren Ansprechen auf zytotoxische Therapien, wie Chemotherapie und Bestrahlung, einher. Dabei stammen die meisten dieser Daten aus Zellkultur Experimenten. Nur wenige Berichte konnten bisher einen solchen Effekt in primärem Tumorgewebe zeigen [44]. Viele Studien haben p53 in Bezug auf Chemotherapie Ansprechen untersucht. Dabei war jedoch immer nur die Mutationsanalyse, also die Unterscheidung zwischen p53 wildtypisch oder mutiert, der differenzierende Faktor. Da TP53 jedoch selbst reguliert wird, ist die funktionelle Situation in einer Zelle wesentlich komplizierter. So kann es in der Gruppe der p53 WT Tumoren ohne weiteres solche geben, die sich bezogen auf Defekte in der p53 Regulation wie p53 MUT Tumoren verhalten. Somit ist TP53 nicht nur ein Schalter, der in den ON- oder wenn mutiert in den OFF-Modus geht. Vielmehr spielt das gesamte TP53 regulierte Netzwerk eine funktionelle Rolle in der Zellbiologie. Vor diesem Hintergrund ist eine alleinige Betrachtung des Mutationsstatus von p53 nicht ausreichend. Insbesondere weil viele der Effektoren von TP53 auch über andere Signalwege reguliert werden können, z.B. den TGF- $\beta$  (*transforming growth-factor beta*)-, RAS/ RAF /MAPK (*rat sarcoma/ RAS associated factor/ mitogen activated protein kinase*)-Signalweg oder auch andere. Daher ist nicht nur der Status von p53, sondern die das komplexe TP53 Netzwerk von Relevanz für eine Beurteilung der TP53-Aktivität. Denn eine mögliche prädiktive Funktion von p53 für das Ansprechen auf Chemotherapie kann nur aus dem Kontext der Regulation und Aktivität relevanter Gene abgeleitet werden, insbesondere da TP53 nur ein Transduktor ist, der durch Sensoren aktiviert wird.

## 4.5 Das TP53 Netzwerk

Das TP53 Netzwerk (Abbildung 10) wird vor allem durch die transkriptionelle Funktion von TP 53 bestimmt, das über Bindungsstellen in den Promotor/ Enhancer Bereichen seine Zielgene reguliert. Weiterhin ist TP53 auch ein mRNA Bindeprotein, wodurch es die Stabilität der gebundenen messenger RNA (mRNA) reguliert [45]. Einen Überblick über die wichtigsten Gene und damit Proteine und deren Rolle und Bedeutung im Zellzyklus (Proliferation und Zellzyklusarrest) und Apoptose finden sich in Abbildung 10.



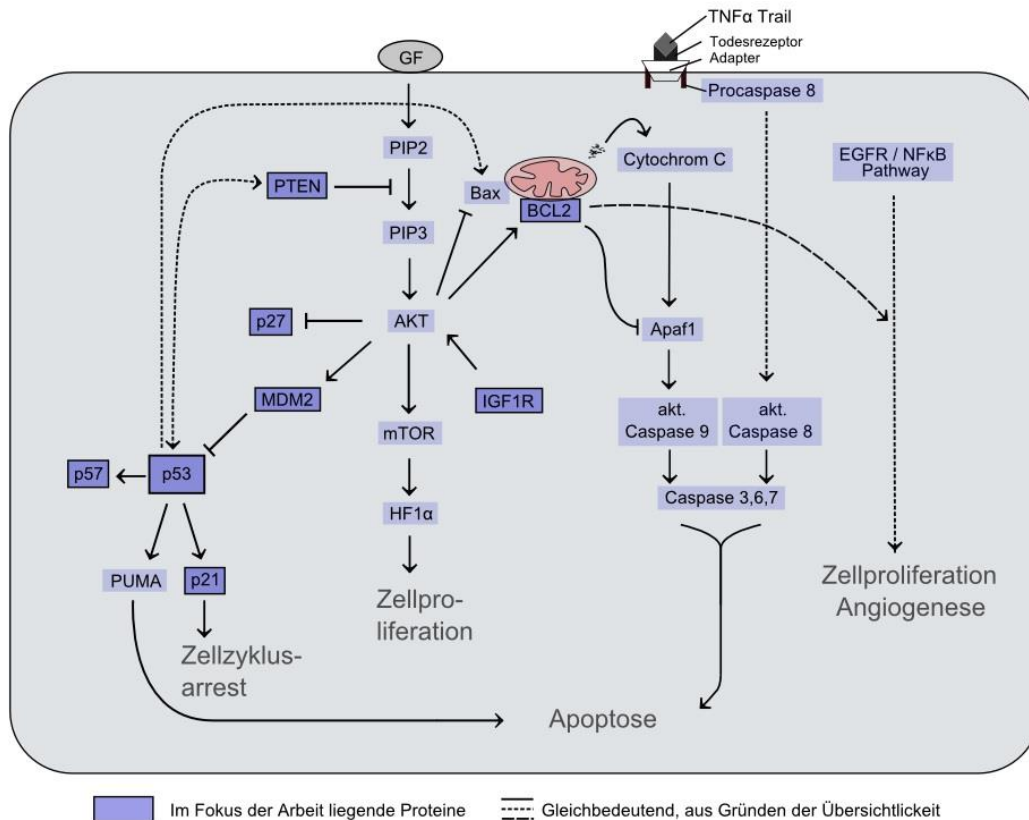


Abbildung 10: TP53 reguliert Zellproliferation, -arrest und Apoptose durch die transkriptionelle Regulation und Interaktion einer Vielzahl von Faktoren.

Proteine oder Faktoren mit einer besonderen Rolle werden im Folgenden kurz vorgestellt:

1. Zellzyklusinhibitoren: p21, p27, p57 (Cyclin-abhängige-Kinase- Inhibitoren) und PTEN (Phosphatase and tensin homolog)
2. Proliferation: IGF1R (*Insulin- like growth factor 1 receptor*)
3. Anti-Apoptose: BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*)
4. TP53 Regulation: MDM2 (*minute double minute 2 homolog*)

Für den  $G_1 \rightarrow S$ -Übergang (*checkpoint*) ist die Regulation der aktivierenden Cyclin D und Cyclin E CDK (*cyclin dependent kinase*) Komplexe durch die Bindung von CDK-inhibitorischer Proteine (CIP) wie p21, p27 oder p57 von zentraler Bedeutung. Diese Inhibitoren dienen dabei als zentrale Plattform der Kontrolle der Regulation des Zellzyklus durch die Integration unterschiedlicher mitogener und antiproliferativer Signale, wodurch eine Zelle zwischen Proliferation und Ruhephase entscheiden kann [46, 47].

Der Weg über den PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)/ AKT (AKR *mouse thymoma*)/ mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Signalweg führt zu verlängertem Zellüberleben, Proliferation und Angiogenese. Die Phosphatase PTEN (*phosphatase tensin homologue*) unterbindet diese Signaltransduktion, indem es die PI3K durch Dephosphorylierung hemmt [48]. Da AKT sowohl BCL2 (*B-cell lymphoma*) als auch p27 reguliert (Abb. 10), führt die Inhibition des PI3K/ AKT/ mTOR Signalwegs durch PTEN zu einer verminderten AKT Aktivität und in der Folge zu niedrigeren BCL2- aber erhöhten p27 Spiegeln. Somit kommt es zu einem Zellzyklus-Arrest und der Einleitung der Apoptose. IGF1R aktiviert den PI3K/AKT und NF- $\kappa$ B- Signalweg (*nuclear factor  $\kappa$ B*) und fördert folglich die Zellproliferation. Dagegen hemmt BCL2 als anti-apoptotisches Protein den intrinsischen Weg von Apoptose: Ebenfalls wird der NF- $\kappa$ B- Signalweg aktiviert, der seinerseits Apoptose hemmt[49]. Diese Proteine sind die eigentlichen Effektoren der Zellzyklusregulation und der Zellproliferation. Ihre Aktivität wird über eine Änderung ihrer Genexpression gesteuert. Dabei ist TP53 einer von vielen Faktoren, der diese regulatorische Aufgabe übernimmt.

Was am Ende zum Ansprechen auf Chemotherapie führt, hängt letztendlich von der Proteinausstattung, dem Proteom, der Zelle und deren Aktivität ab, wobei TP53 nicht notwendigerweise der Hauptregulator sein muss. TP53 kann zwar direkt an die Promotoren/ Enhancer seiner Zielgene binden, doch ist diese Interaktion oft nur eine von vielen Bindungen im *Enhancer* eines Gens. In der Folge erfolgt eine robuste Regulation der Genexpression erst durch die Kombination der Bindung oder des Ausfalls von Transkriptionsfaktoren. D.h. umgekehrt, dass durch den Ausfall von p53 auch andere Transkriptionsfaktoren oder Kombination an Transkriptionsfaktoren reguliert bzw. dereguliert werden können, wodurch eine komplexe Situation der transkriptionellen Regulation entsteht. Eine zusätzliche Steigerung der Komplexität dieser Regulation wird dadurch erzeugt, dass TP53 ebenfalls Faktoren reguliert, die ihrerseits die Transkription beeinflussen [50]. In diese Gruppe an Molekülen gehören micro-RNAs (miRNA), kleine einzelsträngige RNAs, die auf post-transkriptioneller Ebene regulatorisch auf Genexpression wirken.

## 4.6 Interaktion zwischen p53 und Genen durch miRNA

Zunächst aktiviert TP53 als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl an miRNAs. Von 324 verschiedenen getesteten miRNA wiesen 46% eine potentielle TP53 Bindestelle auf. [51] Dadurch wird das bereits komplexe TP53-Regulationsnetzwerk noch komplexer (Abb.11).

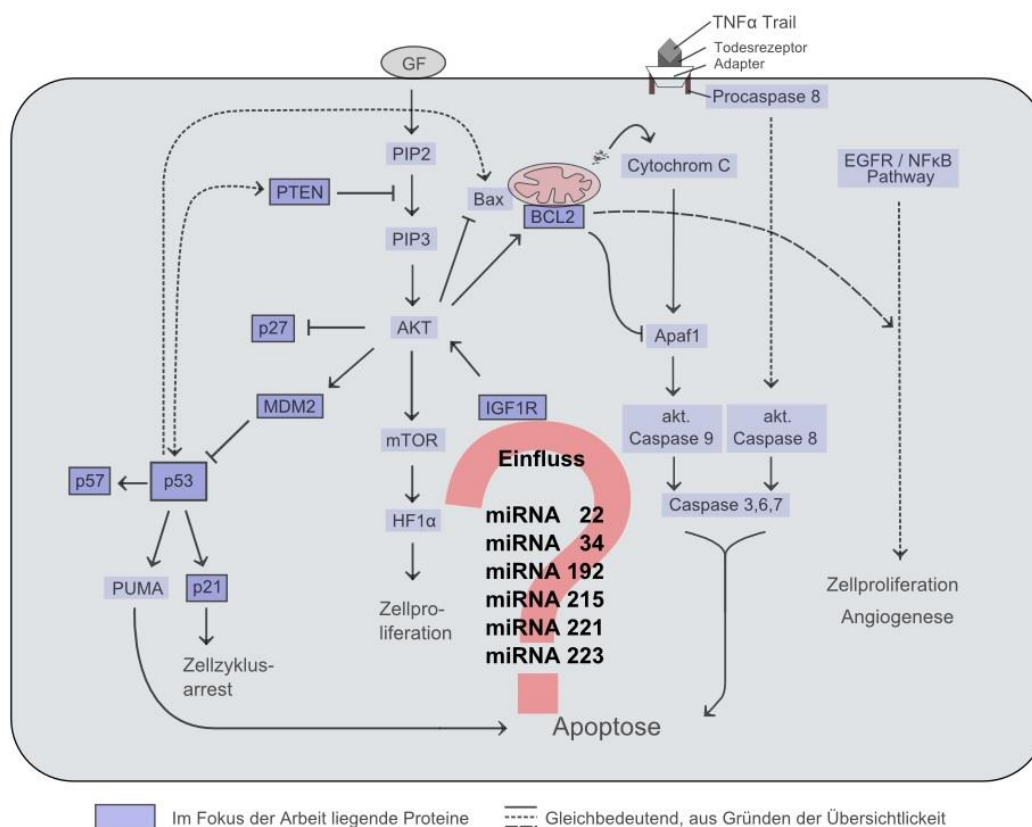
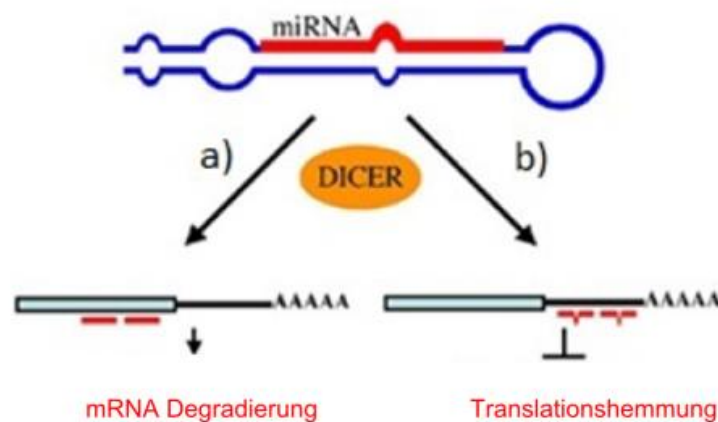


Abbildung 11: TP53 reguliertes Netzwerk (Abb. 10) um miRNA erweitert.

## 5. miRNA

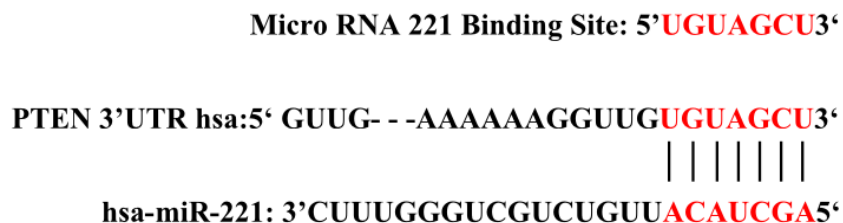
### 5.1 Einführung in die miRNA

Die bereits bekannten Genklassen, Onkogene und Tumorsuppressoren, wurden 1993 durch die Familie der miRNA erweitert. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe regulatorischer Moleküle [52], welche direkt mit der mRNA interagieren können. Somit spielen miRNAs in der post-transkriptionellen Regulation von Genen eine Rolle und wirken sich somit auf das Expressionsmuster einer Vielzahl an Zielgenen aus. Dabei sind diese Gene lediglich durch das Vorhandensein einer komplementären Bindungsstelle zur Sequenz der miRNA gekennzeichnet (*target sequence*). Werden mRNAs durch andere Signalwege transkriptionell reguliert, z.B. PI3K/ AKT/ mTOR, so kann ein Signalweg in den anderen eingreifen, wodurch komplexe Regulationsnetzwerke entstehen können. miRNAs sind bis zu 22 Nukleotide lange, nicht kodierende RNA Einzelstränge, die durch Bindung an einen komplementären mRNA Strang zu dessen Degradierung oder Translationshemmung führen (Abb.12) und damit in der Folge zu einer Verringerung der Menge an translatiertem Protein. Für die Degradation der Ziel-mRNA ist es wichtig, dass die miRNA eine vollständige komplementäre Bindung ihrer *target*-Sequenz in der mRNA- Strang zeigen (Abb.12 a). Im Falle einer partiellen komplementären Bindung, wobei es nur zur Bindung der sogenannten ‚Kern‘ (*core*)- Region zwischen Nukleotid zwei bis sieben der miRNA und der Ziel-mRNA kommt, resultiert eine direkte Translationshemmung. Denn in diesen Fällen kann der Ribosomen-mRNA Komplex nicht mehr entstehen (Abb.12b).



**Abbildung 12: Zwei Mechanismen der negativen Regulierung durch miRNA.** a) Komplette Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA führt zur Degradierung der mRNA; b) Eine partielle Bindung resultiert in der Hemmung der Translation. In beiden Fällen kommt es zu einer Reduktion der Proteinmenge.

Am Beispiel des Gens PTEN soll das Prinzip der miRNA Funktion im Folgenden veranschaulicht werden. miRNA-221 zeigt mit der „*target sequence*“ (Abb. 13, rot), die in der 3'UTR (*untranslated region*) von PTEN liegt, eine Homologie (Abb.12). Durch die Bindung kommt es zur Destabilisierung der RNA oder zu einem Stopp in der Translation. Genau diese *target sequence* findet sich in einer Vielzahl an Genen, die bis in die Hunderte gehen kann[53]. Auf diese Weise wird eine Menge an mRNA definiert, die parallel durch miRNA 221 reguliert werden können, die aber selbst über unterschiedlich Signaltransduktionswege zur Expression gebracht wurden. Auf diese Weise entsteht ein komplexes interaktives Netzwerk, indem TP53 über seinen Regulator miRNA 221 mit einer Vielzahl an Signalwegen interferieren kann.



**Abbildung 13: miRNA 221 Bindung im 3'UTR von PTEN.** Die target sequence, über die miRNA 221 und PTEN aneinander binden, ist in rot dargestellt.

Umgekehrt ist es jedoch möglich, über die *target sequence* –zumindest potentiell - die Gruppe an Genen zu definieren, die über einer entsprechende miRNA reguliert werden [54]. Da die meisten miRNA auf Ebene der Translation in eingreifen, steht der Zelle ein genauer, sofortiger, Energie-effizienter und Signalweg-übergreifender Weg zur Verfügung, schnell die Expression eines Proteins zu regulieren. Rasche Veränderungen der Proteinsynthese sind möglich, ohne auf die Transkriptionsregulation der Gene oder deren nachgeschalteten Prozessierung eingreifen zu müssen. Zudem steht somit ein Mechanismus bereit, der reversibel ist und der Zelle ermöglicht, besonders schnell auf unterschiedliche zytotoxische Stressreize zu reagieren [55]. Da miRNAs direkt wirken, muss kein Umweg über eine Translation gegangen werden.

## 5.2 Einfluss von miRNA auf die Tumorgenese

Da miRNA eine wichtige Rolle in der der Feinregulierung der Genexpression einnehmen, kann dies zu Problemen führen, wenn die Expression der miRNA selbst fehlreguliert wird. Dass dies in Tumoren oft der Fall ist, zeigen miRNA-Expressionsunterschiede, die zwischen Tumor- und Normalgewebe gefunden wurden [39]. Je nachdem über welche Gene miRNA ihre Funktion ausüben, werden Onco-miRNA (tumorfördernde Funktion; OncomiR) von Tumorsuppressor-miRNA (suppressive Wirkung) unterschieden. miRNA funktionieren als OncomiR, wenn eine Erhöhung ihrer Expression oder ein Funktionszugewinn zur Entstehung eines malignen Zellphänotypen beiträgt. So kann die Überexpression einiger miRNA durch Modulation/ *silencing* von Tumorsuppressorgenen, welche der Zellapoptose und Zelldifferenzierung dienen, zu unkontrolliertem Wachstum und somit Tumorbildung führen[56]. Ein Beispiel dafür ist die Wechselwirkung von miRNA-221 auf das Tumorsuppressorgen PTEN (Abb. 13). miRNA können aber auch als Tumorsuppressor-miRNA fungieren, wenn sie für die Herunterregulation von Onkogenen verantwortlich sind und bei eigener verminderter Expression Tumorstadium fördern. Eine Reduktion ihrer Expression oder ihr Funktionsverlust, wie es bei Tumoren oft der Fall ist, trägt zur Entstehung von bösartigen Zellphänotypen bei und fördert hier den kanzerogenen Prozess [57]. Ein Beispiel hierfür ist miRNA-34.

Darüber hinaus kann das Regulationspotential der miRNA (Abb. 14 A) selbst auch betroffen sein. So kann eine miRNA mutiert sein, so dass sie nicht mehr bindet, durch Prozessierungsfehler entsteht eine anders organisierte und damit nicht mehr bindende miRNA. Oder es kommt durch Methylierung des Promoter/ Enhancer Bereiches oder Mutation des regulierenden Transkriptionsfaktors eines miRNA Gens oder des Gens, in das eine miRNA eingebettet ist, zur Reduktion der Expression. In diesem Fall kann die miRNA nicht an das Onkogen binden und dessen Expression hemmen. Somit ist die Runterregulierung von miRNA oft mit den in KKR häufig gefundenen p53 Mutationen assoziiert [58].

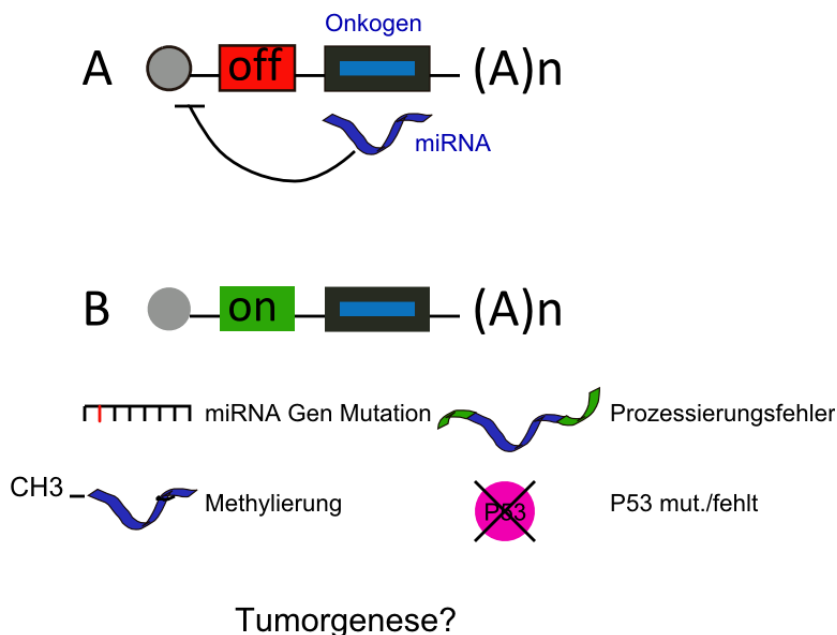


Abbildung 14: Tumorsuppressorwirkung von miRNA (A) und die Auswirkung von Dysfunktionen (B)

### 5.3 TP53 assoziierte miRNA

Erwartungsgemäß werden durch TP53 eine Vielzahl an miRNA reguliert, die in Wechselbeziehung mit einer Vielzahl an Signaltransduktionswegen stehen [59, 60]. Da die Chemotherapeutika über eine Beeinflussung des Zellzyklus wirken, sind für das Verständnis des TP53 regulierten Netzwerks die miRNA von Bedeutung, bei denen eine Wirkung auf Proteine des Zellzyklus beschrieben wurde [61]. Dabei sind grundsätzlich alle miRNA-Gen Beziehungen interessant, auch wenn diese nur bei anderen Tumorarten beschrieben wurden. Für das TP53 regulierte Netzwerk sind die beiden OncomiRs miRNA-221 und -223 sowie die Tumorsuppressor- miRNA miRNA22, -34, -192 und -215 von Bedeutung (Tab. 2).

Funktion	
OncomiR	Tumorsupressor-miRNA
miRNA 221	miRNA 22
miRNA 223	miRNA 34
	miRNA 192
	miRNA 215

Tabelle 2: TP53 regulierte miRNA, die in der Regulation des Zellzyklus involviert sind.

### 5.3.1 miRNA-221

miRNA-221 ist in vielen Tumoren überexprimiert. Ihre Eigenschaft, Tumorsuppressorgene, wie p21 herunter zu regulieren, macht sie zu einer OncomiR. In menschlichen Osteosarkomzellen wurde gezeigt, dass die Überexpression von miRNA-221 einen Rückgang der Apoptose bewirkt und zu Chemotherapieresistenz bei cis-Platintherapie führt. Umgekehrt führte das Ausschalten von miRNA-221 zu Apoptose, einem besseren Ansprechen auf cis-Platin und in der Folge einer Inhibition des Wachstums.[62] Auch Mamma-Karzinome mit hoher miRNA-221 Expression zeigten ein geringeres therapeutische Ansprechen auf Tamoxifen.[63] In kultivierten Prostatakarzinom-Zellen wurde gezeigt, dass es eine negative Korrelation zwischen miRNA-221 und dem Zellzyklusinhibitor p27 gibt. So kommt es zu einem Verlust des  $G_1 \rightarrow S$ -Arrests, was zu unkontrolliertem Tumorwachstum führt.[64]. Zu den Zielgenen von miRNA-221 gehören neben p21 und p27 p57 und PTEN.

### 5.3.2 miRNA-215

miRNA-215 agiert als Tumorsuppressor-miR. Sie führt zur Reduktion der Translation von Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und Thymidilat-Synthetase (TS), die beide essentielle Enzyme für die Nukleotidsynthese und den damit verbundenen Folsäurekatabolismus sind, welcher in Tumorzellen erhöht ist. Außerdem führt sie über die Hemmung der Synthese des Denticless Protein (DTL) zu einem Arrest am Übergang  $G_2 \rightarrow M$ . Dadurch wird die Ubiquitinylierung von TP53 verhindert und das Protein stabilisiert. Dies führt in der Folge zu einer erhöhten p21 Expression und zum Stopp der Zellproliferation. [61] Dieses Phänomen wird bei Patienten mit p53 WT beobachtet. Im Vergleich zu Normalgewebe wird miRNA-215 bei Tumoren vermindert vorgefunden, wodurch nach bereits beschriebenen Erkenntnissen die Zellproliferation erhöht ist. Ob dies entscheidend von Mutiertem p53 abhängt, ist noch nicht genauer untersucht worden und bildet ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die bei verminderter miRNA-215 Expression beschriebene erhöhte Chemosensitivität. Dies wurde für die Stadien II und III des KRK postuliert. [65] Ob die erhöhte Teilungsrate die Wirksamkeit und somit das Ansprechen auf Chemotherapeutika erhöht, ist nicht bekannt und wird in dieser Arbeit untersucht.



### 5.3.3 miRNA-192

miRNA-192 ist aktiv in das TP53 Tumorsupressor Netzwerk eingebunden und hemmt das Zellwachstum. Sie wirkt auch bei einer partiell komplementären Bindung an die mRNA und kann bereits so Translation hemmen. Eine ektopische Expression wird vor allem in p53 WT Zellen vorgefunden. Denn der miRNA-192 Promotor/ Enhancer weist eine TP53 Bindestelle auf. Wird also die TP53 Expression erhöht, zum Beispiel unter Methotrexat (MTX) Therapie durch Induktion eines genotoxischen Stresses, wird dadurch die miRNA-192 Expression erhöht, [55] den miRNA-192 verfügt über eine TP53 Bindungsstelle in ihrem Promoter/ Enhancer. Expression von miRNA-192 führt zur Hemmung der DHFR und über erhöhte Expression von p21 und TP53 zu einem Zellzyklusarrest. Es scheint also einen positiven Feedback- Loop zwischen TP53 und miRNA-192 zu geben. Dass die erhöhte miRNA-192 Expression nicht bei Zellen mit mutiertem oder funktionslosem TP53 zu beobachten ist, kann als weiteres Indiz für die Abhängigkeit der miRNA von p53 WT betrachtet werden. Dieser Tatbestand fördert die Annahme, dass der Wegfall von miRNA-192 ein wichtiger Faktor in der Tumorgenese mKRK sein könnte und damit auch klinische Relevanz haben kann. Da, bei erhöhter miRNA Expression, eine erhöhte Chemosensitivität für Substanzen wie MTX beschrieben ist, könnte in diesem Fall ein Anheben des miRNA Spiegels möglicherweise als therapeutischer Ansatz in Frage kommen. [55], wenn es gelingt therapeutisch Genexpression zu modulieren.

### 5.3.4 miRNA-22

Auch miRNA-22 ist eine Tumorsupressor-miRNA und spielt eine Rolle in der TP53 vermittelten Einleitung der Apoptose. Denn auch sie ist ein TP53 Zielgen, was durch TP53 Bindungssequenzen in den Regulationssequenzen des miRNA-Gens indiziert wird. Als Sensor oder Feinregulator kann sie durch Hemmung ihres direkten Zielgens p21 den Zellzyklusarrest stoppen und in der Folge Apoptose einleiten. Die kann jedoch nur funktionieren, wenn ❶ das p53 Gen im Tumor WT Status ist, also keine inaktivierende Mutation vorliegt, ❷ wenn der genotoxische Stress hoch genug ist, um TP53 WT aktivieren zu können. Ist eine von beiden Voraussetzungen nicht erfüllt, fällt der p21 induzierte Zellzyklusstopp nicht aus. Bei erhöhtem Stress aktiviert p53 neben p21 auch miRNA-22, diese hemmt wiederum p21 und führt direkt zum regulierten Zelltod.[60] Weiter führt miRNA-22 zur Expression von PTEN und induziert somit auch Apoptose.

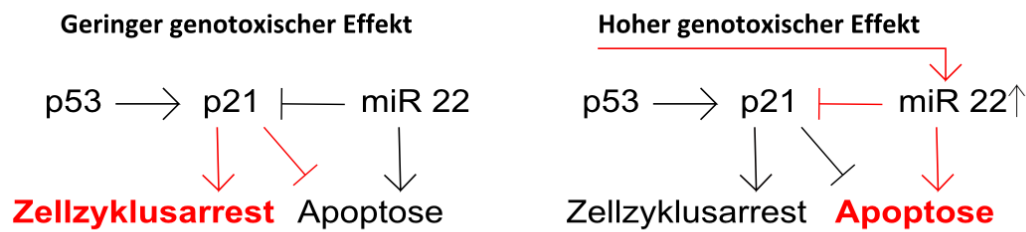


Abbildung 15: Die Wirkung von p53 je nach genotoxischem Stress[36]

Auch in der Angiogenese spielt miRNA-22 eine Rolle, indem die HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia induced factor-1 alpha*) Translation gehemmt wird. Da HIF1- $\alpha$  ein wichtiger Faktor für die Vermittlung von Hypoxie ist, werden durch Änderungen der Expression von miRNA-22 die Auswirkungen von Hypoxie beeinträchtigt. Für Tumoren ist der Ausfall der Angiogenese von besonderer Bedeutung und hat auf der einen Seite negative Folgen für das Tumorstadium [66], induziert auf der anderen Seite aber *cancer stemness* und Metastasierung [67]. Im Vergleich zur anliegenden gesunden Dickdarm-Mucosa zeigt das Tumorgewebe oft reduzierte miRNA-22 Expressionsniveaus. In einigen Fällen ist das miRNA-22 Gen deletiert. In der Konsequenz fällt die wachstumshemmende Wirkung von miRNA-22 weg. Klinische Relevanz haben niedrige miRNA-22 Spiegel, da sie sowohl mit einem schlechteren postoperativen Gesamtüberleben als auch mit der Bildung von Lebermetastasen signifikant korrelieren [68]. Letzteres steht womöglich mit dem oben beschriebenen Einfluss auf die Angiogenese, der bei Wegfall der miRNA-22 zu erhöhter VEGF Expression führt, in Zusammenhang und ist ein essentieller Schritt für die Metastasen Bildung [66]. Eine mögliche Funktion von miRNA-22 als prognostischer Biomarker ist bisher nicht bekannt.

### 5.3.5 miRNA-223

miRNA-223 wurde sowohl als OncomiR als auch Tumorsuppressor-miRNA beschrieben [69, 70]. Sie ist in vielen kolorektalen Karzinomen hochreguliert [71]. Untersuchungen zeigten, dass miRNA-223 besonders in späten klinischen Stadien stark exprimiert wird. Umgekehrt führte eine experimentelle Reduktion von miRNA-223 zu herabgesetzter Zellproliferation und Migration [69].

miRNA-223 wirkt vor allem durch Regulation der FOXO1-mRNA (*Forkhead Box O Transkriptionsfaktor*), die eine komplementäre *target* Sequenz für miRNA-223 enthält. FOXO1 hat eine wichtige Funktion in Zellzyklus, Apoptose, Glucosemetabolismus und DNA Reparaturmechanismen [72], also zentralen Elementen (*hallmarks*) der Zellbiologie von Tumorzellen.

### 5.3.6 miRNA-34

miR-34 wird ebenfalls direkt von TP53 reguliert. Es gibt drei verschiedene miRNA-34 Familienmitglieder, welche mit a, b, c gekennzeichnet werden. Alle drei Formen sind TP53 Zielgene. miR-34 greift durch Herunterregulation von BCL2 (*B-cell lymphoma*), KIT (*kitten induced cancer*) sowie eine Expressionssteigerung von SIRT-1 (*NAD<sup>+</sup>-dependend deacetylase Sirtuin*), die wiederum zu einer Expressionssteigerung von p53 führt, als Tumorsuppressor. [73] TP53 kann somit durch die Induktion von miRNA-34 in einer *feed-forward* Regulation auch seine eigene Anreicherung bewirken. [74-78]

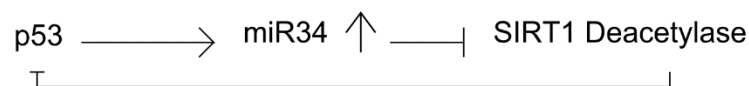


Abbildung 16: Die stabilisierende Wirkung von miRNA 34 auf p53

## 5.4 miRNA-22, -34, -192, -215 und -223 als prädiktive Biomarker

Auf Basis des Wirkmechanismus der Chemotherapie sowie der Funktion des TP53 Netzwerkes ergab sich die Hypothese, dass die untersuchten miRNA das Therapieansprechen von Patienten mit KHK auf Chemotherapie prädictieren können. Da die Rolle von TP53 in seiner Funktion als Prädiktor noch umstritten ist, jedoch eine essentielle Rolle in der Regulation von Proliferation und Apoptose einnimmt, sollen miRNA, die durch TP53 reguliert werden und eine regulierende Funktion für Proliferation und Apoptose haben, auf ihr prädiktives Potential hin untersucht werden. In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche Analysen zur miRNA Expression in Relation zur Chemotherapie durchgeführt.

Die Ergebnisse sind oft wegen unterschiedlicher Tumorentität oder unterschiedlich großen Kollektiven nicht zu vergleichen. So wird in der Literatur für die Therapie mit Paclitaxel beschrieben, dass die Resistenzen in p53 MUT Tumoren durch miRNA-22 reversibel sind.

Transfektion von miRNA-22 in Kolonzellen führte zu vermindertem Zellüberleben und förderte die inhibitorische Funktion von Paclitaxel. Warum diese Funktion nur in p53 MUT Zellen der Fall war, wurde bisher nicht aufgeklärt.

Weiterhin wurde *in vitro* an Zelllinien gezeigt, dass eine hohe Expression von miRNA-215 zu erhöhter Chemoresistenz bei Therapie mit 5-FU führt. Auch gab es eine positive Korrelation zwischen hohen miRNA-215 Spiegeln und schlechter Prognose. Eine Herunterregulation von miRNA-215 bei Patienten mit rektalem Karzinom korrelierte mit besserem Ansprechen. [79] miRNA-215- und miRNA-192 inhibieren zwar beide die TYMS, aber durch ihre pleiotropen Effekte führen sie zu einer erhöhten Resistenz bei Chemotherapeutika, auch solchen, die über TYMS wirken.[80]

## 6. Arbeitsmodell

❶ Aufgrund der Unklarheit der Rolle von TP53 in der Regulation von Chemoresistenz wurden seine miRNA Zielgene miRNA-22,- 34, -192, - 215, -221 und -223 und deren *target* Gene BCL2, MDM2, p21, p27, p57, PTEN oder IGF-1R als Indikatoren für die Wirkung der miRNA mit in die Betrachtung aufgenommen, denn die miRNA bilden zusammen mit ihren *target* Genen ein komplexes TP53-Netzwerk, das als Modell für die Suche und Evaluation von prädiktiven Biomarkern für Chemotherapie fungieren kann (Abb. 11).

❷ Um die Anzahl der Nebeneffekte (*confounder*) so klein wie möglich zu halten, sollten die Untersuchungen an einem randomisierten klinischen Studienkollektiv durchgeführt werden, um die Analyseergebnisse auf eine solide statistische Grundlage zu stellen.

❸ Aus diesen beiden Grundlagen ergab sich die Arbeitshypothese dieser Doktorarbeit:

miRNA-22, -34, -192, -215 und -223 prädictieren das Therapieansprechen von mKRR auf Chemotherapie (FIRE-1: FUFIRI vs. mIROX)

Weiterhin ergaben sich aus diesem Modell und den Grundannahmen direkt der Arbeitsplan (Abb. 17) und daraus die durchzuführenden Arbeitsschritte.

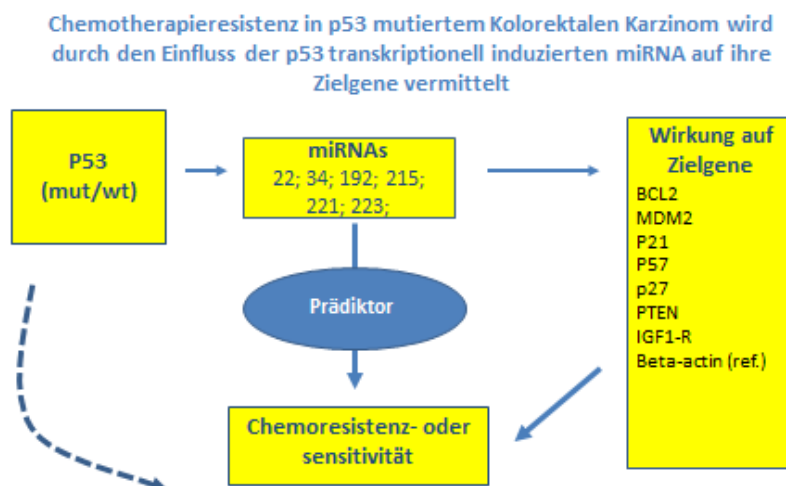


Abbildung 17: Arbeitsplan

## II. Material und Methoden

### 1. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchung sollte ein randomisiertes klinisches Studienkollektiv von Patienten mit mKRK eingesetzt werden, die mittels Chemotherapie behandelt worden waren, ohne Einbinden zielgerichteter Therapeutika. Auf diese Weise sollten andere Einflussgrößen (*confounder*) so klein wie möglich gehalten werden. Daher wurde hier ein Subkollektiv der FIRE-1 Studie eingesetzt. FIRE-1 ist eine multizentrische Studie, die im Zeitraum von Juli 2000 bis Oktober 2004 durchgeführt wurde und in der 495 Patienten mit mKRK rekrutiert wurden [81]. Eingeschlossen wurden dabei Patienten zwischen 18 und 75 Jahren mit gesichertem histologischem Tumornachweis, welche noch keine Therapie zur Behandlung der metastasierten Erkrankung erhalten hatten. Bei adjuvanter Vorbehandlung war ein sechsmonatiges therapiefreies Intervall Bedingung, sowie keine Anwendung von DNA-Topoisomerase-I Inhibitoren oder Platinderivaten [82]. Aufgrund der großen Zahl an Untersuchungen, die mit dem Material aus der FIRE-1 Studie bereits durchgeführt wurden, enthielten etliche der asservierten Tumorblöcke kein oder zu wenig brauchbares Material. Insgesamt standen noch 119 Patientenproben (24.0%) zur Verfügung (Abb. 18).

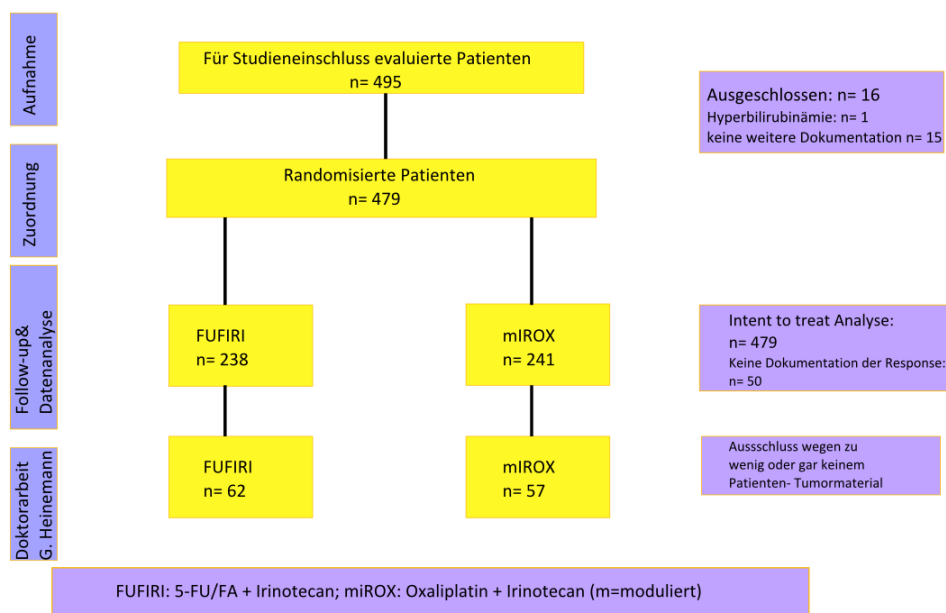


Abbildung 18: Kohortendiagramm der Studie

## 1.1 Therapieschema des FIRE-1 Studie

Für die Erstlinientherapie der mKRK der Patienten der FIRE-1 Studie wurden zwei Therapieprotokolle eingesetzt:

- ❶ FUFIRI (Referenzarm) (Tabelle 3),
- ❷ mIROX (experimenteller Arm) (Tabelle 4).

Substanz	Dosierung	Applikation	Therapietage	Wiederholung
Irinotecan	80 mg/m <sup>2</sup> i.v.	30-min Infusion	T1, 8, 15, 22, 29, 36	Wiederholung T50
Folinsäure	500 mg/m <sup>2</sup> i.v.	120-min Infusion	T1, 8, 15, 22, 29, 36	Wiederholung T50
5-FU	2000 mg/m <sup>2</sup> i.v.	24-h- Infusion	T1, 8, 15, 22, 29, 36	Wiederholung T50

**Tabelle 3: Therapieprotokoll FUFIRI (Referenzarm).** Ein Therapiezyklus umfasste Tag 1 bis 49, mit einer einwöchigen Pause. Der Beginn des Folge-Zyklus startete somit an Tag 50.

Substanz	Dosierung	Applikation	Therapietage	Wiederholung
Irinotecan	80 mg/m <sup>2</sup> i.v.	30-min Infusion	T1, 8, 15, 22, 29, 36	Wiederholung T50
Oxaliplatin	85 mg/m <sup>2</sup> i.v.	120-min Infusion	T1, 15, 29	Wiederholung T50

**Tabelle 4: Therapieprotokoll mIROX (experimenteller Arm).** Ganz analog zum Referenzarm FUFIRI (Tabelle 3) umfasste für den experimentellen mIROX Arm ein Therapiezyklus Tag 1 bis 49 und enthielt am Ende eine einwöchige Therapie-Pause. Der Beginn des Folge- Zyklus startete somit an Tag 50

## 1.2 Klinisch- pathologische Charakterisierung des verwendeten FIRE-1 Patientenkollektivs

Die klinischen Daten des vorhandenen FIRE-1 Restkollektivs wurden mit dem der FIRE-1 Studie verglichen [81] (Tabelle 5), um zu prüfen, ob die noch vorhandenen Fälle repräsentativ für die gesamte FIRE-1 Studie waren.

	FUFIRI (n=62)		mIROX (n=57)	
<u>Patientencharakteristik</u>	<u>n=</u>	<u>%</u>	<u>n=</u>	<u>%</u>
<b>Geschlecht:</b>				
männlich	37	59,7	41	71,9
weiblich	25	40,3	16	28,1
<b>Alter [Jahre]</b>				
<50	3	4,8	7	12,3
>50	59	95,2	50	87,7
<b>Karnofsky Performance Status</b>				
100%	26	41,9	30	52,6
70-90%	36	58,1	27	47,4
<b>Primärtumor</b>				
Kolon	40	64,5	37	64,9
Rektum	22	35,5	20	35,1
<b>Adjuvante Vorbehandlung</b>				
Ja	13	21,0	14	24,6
Nein	49	79,0	43	75,4
<b>T- Stadium</b>				
T1 / T2	3	4,8	6	10,5
T3 / T4	56	90,3	51	89,5
NA	3	4,8	-	-
<b>Anzahl der Metastasen</b>				
1	38	61,3	38	66,7
≥ 2	24	38,7	18	31,6
NA	0	0,8	1	1,7

Tabelle 5: Klinisch- pathologische Charakterisierung des Teilkollektivs der FIRE-1 Studie, die in die vorliegende Untersuchung einbezogen wurde.

## 2. Methoden

### 2.1 Arbeitsplan – Methodik

Durch den Arbeitsplan (Abb. 17) wurden die einzelnen Schritte der Untersuchung bereits vorgegeben. Grundsätzlich wurden von den Fällen zu einem eine histomorphologisch-immunhistochemische Analyse der TP53 Expression durchgeführt. Diese wurde mit den Mutationsergebnissen aus Sequenzuntersuchungen der DNA verglichen. Parallel dazu wurden die Expressionsniveaus der miRNA-22, -34, - 192, 215, - 222 und – 223 sowie der mRNAs BCL2, IGF1-R, MDM2, p21, p27, p57, PTEN und  $\beta$ -Aktin als Referenzgen mit Hilfe von RT-qPCR (*Reverse Transcription Quantitative PCR*) RNA untersucht (Tabelle 6).

Gewebe	DNA	miRNA	mRNA
Immunhistochemie	Extraktion	Parallele Extraktion (gemeinsames Kit)	
	PCR	Reverse Transkription	Reverse Transkription
	Sequenzierung	qPCR	qPCR

Tabelle 6: Arbeitsplan



## 2.2 RNA Extraktion

### 2.2.1 FFPE Gewebe

Für die histologischen Untersuchungen, Mutations- und Expressionsanalysen von Tumorgewebe wurden 5 µm dicke Serienschnitte mittels eines Mikrotoms angefertigt, über Nacht bei 52°C getrocknet und die FFPE Schnitte anschließend mithilfe von Xylol und Ethanol deparaffiniert. Hierfür wurden die Schnitte nacheinander für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur in jeweils drei Küvetten mit Xylol oder Ethanol gegeben. Nach jeweils 50 Entparaffinierungsschritten wurde die erste Küvette geleert und neu aufgefüllt. Anschließend wurden die verbleibenden beiden Küvetten in ihren Positionen vertauscht (Küvette Position 2 auf Position 1, Küvette Position 3 auf Position 2). Die frisch befüllte Küvette wurde anschließend in Position 3 gestellt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass eine optimale und saubere Entparaffinierung erfüllt war (Nernst Gesetz).

### 2.2.2 Mikrodisektion

Um die Ergebnisse der Sequenzierung und der Expressionsanalysen mit einer erhöhten Genauigkeit zu erzielen, wurden Tumor-haltige Gewebeareale mit Hilfe von makroskopischer Mikrodisektion gewonnen. Dazu wurden die Tumor-haltigen Areale durch einen Facharzt für Pathologie (PD Dr. Dr. Jens Neumann) auf einem Referenz-HE-Schnitt eingezeichnet, dieses Muster auf einen zur Deckung gebrachten entparaffinierten Serienschnitt übertragen und schließlich mit Hilfe eines Skalpell abgekratzt.

Die so gewonnenen Gewebefragmente wurden zum einen zur Isolation von DNA (s.o.) oder RNA eingesetzt (s.u.).

### 2.2.3 RNA Isolation

Für die Gewinnung der RNA wurden *RNeasy Plus Mini Kits* nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden Deutschland) eingesetzt. Dazu wurde das mikrodisezierte Material in ein Gemisch aus PK (Proteinase K) Puffer, Wasser und Proteinase K gegeben. Die Proben wurden 15min bei 56°C und nachfolgend 15 min bei 80°C inkubiert. Um die beiden Inkubationsschritte schnell nacheinander durchführen zu können, wurden zwei Thermoinkubatoren eingesetzt. Anschließend wurden die Proben für drei Minuten auf Eis

gelegt und anschließend 20 min bei 13000 rpm (*revolutions per minute*) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß mit DNA Booster Puffer und DNase I gegeben. Dabei war es wichtig, dass das durch die Zentrifugation gebildete *Pellet* nicht beschädigt und mit überführt wurde. Nach Zugabe von RBC Puffer und 96 % Ethanol wurde der Ansatz mittels mehrerer Zentrifugationsschritte und der Zugabe von RPE Puffer in speziellen *Spin Columns* gewaschen. Am Ende wurden die RNA, welche in der Spin Column gebunden war, durch Zugabe von RNase-freiem Wasser in Lösung gebracht und eluiert. Das Eluat wurde bei -20°C aufbewahrt.

## 2.3 Bestimmung des p53 Mutationsstatus

Neben dem, immunhistochemischen Nachweis von TP53 als Surrogat für p53 Mutationen, wurde der Mutationszustand der p53 Gens auch durch direktes DNA Sequenzieren verifiziert. Für diesen Nachweis von Mutationen im p53-Gen wurde wie bereits beschrieben aus entparaffinierten Geweben mit Hilfe von Mikrodissektion Tumor haltige Areale gewonnen. Durch die Fixierung der Gewebe mit Hilfe von Formalin (Formaldehyd) kann es zur Deaminierung von Nukleinsäuren kommen, die vor allem zu Transition von Cytosin- in Uracil Reste führen. Diese Transitionen würden eine artifiziellen Sequenzveränderung führen, die in sich einer anschließenden PCR als Thymidin-Restgruppen darstellen würden. Daher wurde die DNA mit Hilfe von Qiagen *GeneReader Kits* (Qiagen, Hilden) gewonnen, die einen Uracil-deglykosylase Schritt enthalten, der Uracilreste aus der DNA entfernt, sodass diese nicht mehr amplifiziert werden können. Neben dieser chemischen Modifikation können durch die unkontrollierbaren Zeiten während der Operation (warme- und kalte Ischämie: Hypoxie) und schlechte Lagerung der Gewebestücke zusätzliche Artefakte entstehen, die sich vor allem im Abbau von RNA oder Proteinen äußern, sodass die nachgewiesenen Mengen nicht mit der Realität übereinstimmen. Auch durch die zum Teil langen Lagerungszeiten der Gewebestücke von mindestens 10 Jahren können sich weitere Probleme durch Oxidation der Gewebeproben ergeben.

Die Sequenzierung erfolgte für die Exonen 5 bis 9 des p53 Gens, denn in diesen Exonen finden sich die meisten der bekannten Mutationen im p53 Gen. Dazu wurde NGS (*next generation sequencing*) unter Einsatz einer Ion Torrent PGM (*personal genome machine*) eingesetzt. Dazu wurde die gewonnene DNA fragmentiert und mit Hilfe von *Cancer Hotspot Panels v.2.0* ® amplifiziert. An die so hergestellten Fragmente der *Library* wurde über einen

enzymatische Hydrolyse- Ligationsschritt (FuPa) Adapter gekoppelt, die eine Kopplung an ca. 20 µm große *Beads* ermöglichen, sodass in einer anschließenden *emulsion PCR* eine klonale Amplifikation ermöglicht wurde. Diese *Beads* wurden dann auf einen Ion-Chip, eine Picotiter Platte, verteilt. Die an diesen *Beads* hängenden DNA Einzelstränge dienten als *template* für den Nukleotideinbau. Dabei binden die Sequenzprimer an die ligierten Adapter. In einem Sequenzierzyklus (*flow*) wurden nacheinander die 4 Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) hinzu gegeben. Durch den Einbau komplementärer Nukleotide kam es neben der Freisetzung von Pyrophosphat auch zur Abgabe eines Protons ( $H^+$  - Ion). Dieses führt durch Aufnahme eines Elektrons aus dem negativ dotierten Halbleiter der Picotiterplatte zu einem Stromfluss, der gemessen wird. Die so gewonnen Daten wurden anschließend mit Hilfe der Ion-Reporter Software ausgewertet. Die Sequenzierarbeiten würden im Labor von Prof. Dr. Reinhold Schäfer, Pathologisches Institut der Charité, Berlin durchgeführt und die Daten für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.3.1 Immunhistochemie

TP53 hat eine kurze Halbwertszeit von etwa 20 bis 30 Minuten, wodurch es immunhistochemisch nicht nachweisbar ist. Durch Mutationen steigt die Halbwertszeit deutlich an, sodass in Zellen mit p53 Mutation TP53 immunhistochemisch nachweisbar wird. Somit eignet sich der immunhistochemische Nachweis von TP53, um Mutationen nachzuweisen, speziell weil sich TP53 in gesundem Gewebe (Normalgewebe) nicht bis kaum nachweisbar ist. In Tumorgewebe mit mutiertem TP53 wird oft auch eine erhöhte Konzentration an TP53 gefunden, da die mutierte Form das TP53 WT durch Bildung von Multimeren ebenfalls in seiner Konformation verändert, wodurch es stabilisiert wird und folglich in den Zellen akkumulieren kann. Zusätzlich ist auch die Ubiquitinierung herabgesetzt, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung und damit Anreicherung beiträgt [83].

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Tatsache, dass TP53-spezifische Antikörper (anti-p53 Maus Antikörper, clone Ab-5, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Dilution 1:1000) an die entsprechende Zellkomponenten auf einem Gewebeschnitt binden. Bei der hier angewandten indirekten immunhistochemischen Methode wird in einem zweiten Schritt der primäre antigenspezifische- durch einen zweiten Antikörper sichtbar gemacht, an den ein Enzym gekoppelt ist, dass ein wasserunlösliches Präzipitat bildet (XT UltraView Diaminobenzidine Kit; Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ) (Abb. 19). Die gesamte

Prozedur der immunhistochemischen Färbung Schritte wurden unter Einsatz eines Ventana Benchmark XT Autostainers durchgeführt.

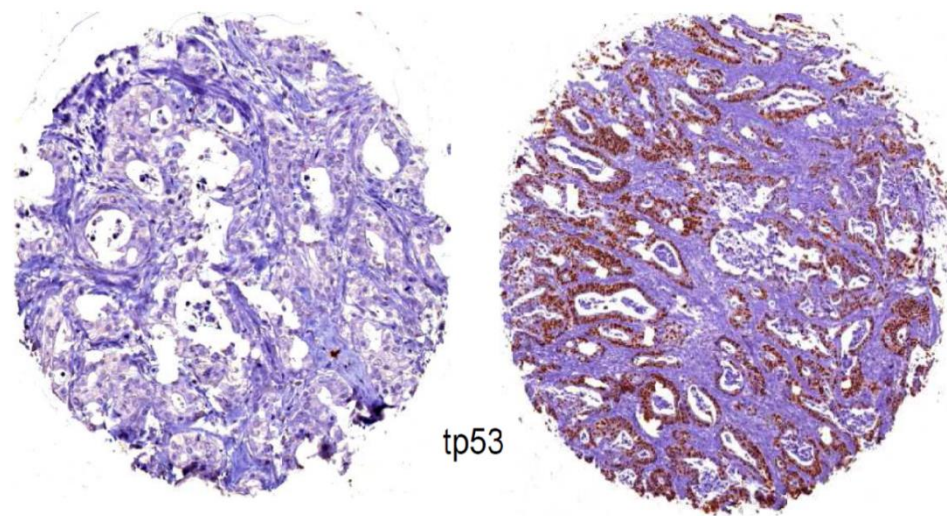


Abbildung 19: Beispiele für Negativität (links) und Positivität (rechts) des immunhistochemischen TP53 Nachweises. Tumorzellen der glandulären Strukturen zeigen eine immunhistochemische Reaktion.

## 2.4 Primeroptimierung für RT-qPCR

Um RT-qPCRs (*reverse transcriptase quantitative PCR*, *polymerase chain reaction*) optimal laufen zu lassen, wurden die Konzentrationen der PCR-Primer aufeinander abgestimmt. Für die Primeroptimierung gibt es eine Vielzahl von Abwandlungen, die für spezielle Anforderungen optimiert sind. Dabei sind Temperatur, Dauer der PCR-Zyklen und die Zyklenzahl im Wesentlichen optimiert und werden daher nur noch in engeren Grenzen verändert. Bei dem hier vorgestellten Verfahren werden diese Parameter jedoch nicht geändert, sondern die Konzentration der Primer bestimmt, mit denen die besten Ergebnisse für die qPCR erzielt werden. Um später Kontaminationen mit DNA praktisch auszuschließen, wurden die Primer so gelegt, dass Sie mindestens ein Intron überspannten. Auf diese Weise ergaben sich nur auf Ebene der RNA/ cDNA ausreichend kurze Stücke, die sich amplifizieren ließen. Die Optimierung wurde in zwei Schritten durchgeführt:

- ❶ Herstellung von PCR-Produkten als *template* für die qPCR.
- ❷ Optimierung der Primerkonzentrationen in der qPCR.

### 2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um qPCRs optimieren zu können, mussten zunächst *templates* hergestellt werden. Dazu wurden mit Hilfe einer einfachen PCR unter Einsatz einer cDNA Mischung als *template* empirisch die Schmelztemperatur (*annealing temperature*) bestimmt, bei der sich das PCR am saubersten ergab: hohe Bandenintensität, keine PCR Nebenprodukte (*by-products*). Dazu wurde eine Temperaturoptimierung durchgeführt, um dabei den Ansatz zu finden, der das beste Resultat lieferte. Der PCR-Ansatz bestand dabei aus der cDNA Mischung als *template*, den zu testenden Primern, desoxy-Ribonukleotiden, den Monomeren für die Polymersiations-Reaktion, der Taq DNA-Polymerase (einem hitzestabilen Enzym, das in dem Archebakterium *Thermus aquaticus* gefunden wird und das die Amplifikationsreaktion katalysiert),  $Mg^{2+}$ -Ionen (als Ko-Faktor der Taq DNA-Polymerase) und einem geeigneten Reaktions-Puffer. PCRs basieren auf wiederkehrenden Replikationszyklen, die in drei Stufen ablaufen:

- 1. Denaturierung:** Erhitzen auf 95°C führt zur Strangtrennung, sodass aus dsDNA (*double stranded DNA*) ssDNA (*single stranded DNA*) gebildet wird.
- 2. Annealing:** Herabsetzen der Temperatur auf 50 - 60 °C ermöglicht die Hybridisierung von Primern an die ssDNA. Dabei kommt nur dann zu einer reversiblen aber stabilen Bindung, wenn die Primer-Sequenz und Matrizen-Sequenz zueinander komplementär sind.
- 3. Extension:** Erhöhung der Temperatur auf 72°C, die das Optimum für die Taq-DNA-Polymerase darstellt. Diese baut Nukleotide an die 3'-Enden der hybridisierten Primer an, um den Strang in 5' → 3' Orientierung zu elongieren.

Die Zahl der DNA-Moleküle wird idealerweise nach jedem Zyklus verdoppelt, was meist jedoch nicht erreicht wird, da Produkte enthalten sein können, welche die Polymerase hemmen. Weiterhin nimmt mit zunehmender Zyklenzahl die Effizienz der Vermehrung ab, weil sich die Reaktionsbedingungen verschlechtern, insbesondere weil Primer und Nukleotide im Laufe der Reaktion aufgebraucht werden. Schließlich bestimmt die zu amplifizierende Sequenz die Effizienz der PCR maßgeblich, sodass nur bei wenigen Primerpaaren optimale Amplifikationsraten erreicht werden:

- $f(x) = n^x$ ; Idealfall:  $n=2$ ; ), Regelfall:  $n<2$ ).

Pipettieransatz für eine PCR mit 25µl Endvolumen:

Material	Konzentration	Volumen [µl]
PCR-Puffer	10x	5.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5
dNTP	je 10 mM	1.0
Forward-Primer	10 µM	0.5
Reverse-Primer	10 µM	0.5
<i>Taq</i> DNA Polymerase <i>Maxima, Thermo Fisher</i>	5 U/µl	0.2
Template-DNA		1.0
H <sub>2</sub> O		14.3
Gesamtvolumen		25.0

Tabelle 7: Pipettieransatz PCR

Für Standard-PCRs wurden lediglich die *annealing* Temperaturen verändert, indem ein Temperaturgradient über acht verschiedene Temperaturen laufen gelassen wurde. Da Primer mit einer theoretisch berechneten *annealing* Temperatur von 60°C konstruiert wurden, wurde der Temperaturgradient Gradient in einem PCR-Gerät mit Gradiententhermoblock (Mastercycler, Eppendorf) über den Bereich 55.3°C, 57.0°C, 59.1°C, 61.5°C, 63.9°C, 66.3°C, 68.4°C, 70.2°C gelegt. Dadurch wurde zwischen einzelnen Ansätzen etwa eine Differenz von 2°C erzielt werden.

Standard-Temperaturprofil einer Polymerase-Kettenreaktion

1. Initiale Denaturierung: 95 °C 5 min

## 2. PCR Zyklen

Denaturierung: 95 °C 30 sek

Primer-Annealing: ΔT (Temperaturgradient) , 30 sek

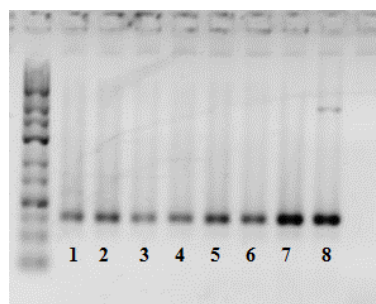
55.3°C, 57.0°C, 59.1°C, 61.5°C, 63.9°C, 66.3°C, 68.4°C, 70.2°C

Extension: 72 °C 30 sek

3. Finale Extension: 72 °C 5 min

## 2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR beurteilen zu können, wurden die gewonnenen amplifizierten PCR Produkte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Dazu wurden zunächst Agarosegele hergestellt. Zu 80ml 0.5xTBE Puffer wurden etwa 3 g Agarose gegeben, gemischt und in einer Mikrowelle erhitzt. Das verdunstete Volumen wurde mit Wasser auf 80ml und die verbleibenden 20ml mit 0.5xTBE Puffer aufgefüllt. Nach dem Mischen wurden 5µl Ethidiumbromid (10mg/ml, Carl Roth GmbH) dazugegeben, erneut gemischt und das Gemisch in eine Gelschale gegossen. In diese wurde zur Bildung der Taschen ein Kamm eingehängt. Nach einer halben Stunde war das Gel fest. Der Kamm wurde aus dem erhärteten Gel gezogen, dieses in die Gellaufkammer transferiert und die PCR Produkte für die Auftrennung vorbereitet. Dazu wurde zu 1µl 10xBlaupuffer (90% Formamid, 0.01% (w/v) Xylencyanol, 0.01% (w/v) Bromphenolblau) 9µl PCR gegeben. Zur Abschätzung der Länge der PCR Produkte wurden in die erste Spur 2µl 100bp (GeneRuler®, Thermo Fisher) gegeben und in die Folgespuren 10µl der PCR-Produkt/ Blaupuffer-Mischungen. Anschließend wurden die PCR Produkte im elektrischen Feld aufgetrennt (100V, 20 min). Aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrats wandert DNA als Polyanion in einem elektrischen Feld von der Anode zur Kathode. Bei der Wanderung durch ein engmaschiges Netz (z. B. Agarosekolloide) korreliert die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional mit dem Logarithmus der Molekülgröße. Kleine Moleküle wandern somit deutlich schneller als große Moleküle. Durch den interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid können doppelsträngige Nukleinsäure-Moleküle im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel auf einen Transilluminator UV-Licht-Tisch (alpha-Innotech, Biozym) gelegt und fotografiert, um festzustellen, ob eine starke einzelne Bande mit der erwarteten Länge des PCR-Produkts vorhanden war. War ein solches PCR-Produkt vorhanden, so war damit erfolgreich das *template* für die qPCR vorhanden (Abb. 19).



**Abbildung 20: Temperaturoptimierung.** Die Spuren 1-8 entsprechen dem Ergebnis des Temperaturgradienten ① 55.3°C, ② 57.0°C, ③ 59.1°C, ④ 61.5°C, ⑤ 63.9°C, ⑥ 66.3°C, ⑦ 68.4°C, ⑧ 70.2°C

### 2.4.3 Konzentrationsverhältnis- Optimierung

Da sich die Reaktionsbedingungen zwischen einer Standard-PCR (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) und einer RT-qPCR (6.0 mM MgCl<sub>2</sub>) erheblich voneinander unterscheiden, können die Bedingungen aus Standard-PCRs nicht ohne weiteres auf RT-qPCRs übertragen werden, was eine weitere Optimierung der qPCR notwendig werden lässt. Da hohe Magnesiumchlorid Konzentrationen die Bindung von Primern beeinflussen, werden für die Optimierung von qPCRs üblicherweise die Konzentrationen der beiden Primer, Primer 1(forward) und Primer 2 (reverse), optimiert (Tabelle 7). Gemäß SOP (*standard operating procedure*) wurden im Dreifachansatz (Triplikat) qPCRs in vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt, um so alle Kombinationen möglicher Konzentrationsstufen der Forward- und Reverse-Primer (jeweils mit 300nM und 900nM) zu testen. Die Sonde wurde in einer konstanten Konzentration von 200nM eingesetzt. Als *template* dienten hierbei 50000 Kopien des zuvor hergestellten und gereinigten (Qiagen PCR purification kit) PCR-Produkts. Nach dem qPCR Lauf wurde aus den 4 Kombinationen von Primerkonzentrationen diejenige ausgewählt, deren Cp-Wert (*critical point*) am kleinsten war, also die beste Amplifikation des *templates* ergab (Abb. 20). In der Regel lieferten mehrere Konzentrationskombinationen denselben oder zumindest ähnlichen geringen Cp-Wert. In diesen Fällen wurden die Kombinationen bevorzugt, die die geringsten Primerkonzentrationen enthielten. Auf diese Weise konnten für die untersuchten Zielgene optimierte Bedingungen geschaffen werden, die in für die experimentellen Untersuchungen eingesetzt werden konnten (Tab. 8).

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
300nM/300nM	300nM/900nM	900nM/300nM	900nM/900nM

**Tabelle 8: Verschieden Kombinationen von Primer Konzentrationen.** Primer 1 (rot) und Primer 2 (blau) wurden in verschiedenen Konzentrationen gemischt.



300/300	19.62
300/300	19.76
300/300	19.75
300/900	19.51
300/900	18.07
300/900	19.17
900/300	28.72
900/300	20.23
900/300	20.21
900/900	20.52
900/900	20.02
900/900	18.96
H <sub>2</sub> O	28.44
H <sub>2</sub> O	28.86
H <sub>2</sub> O	28.56

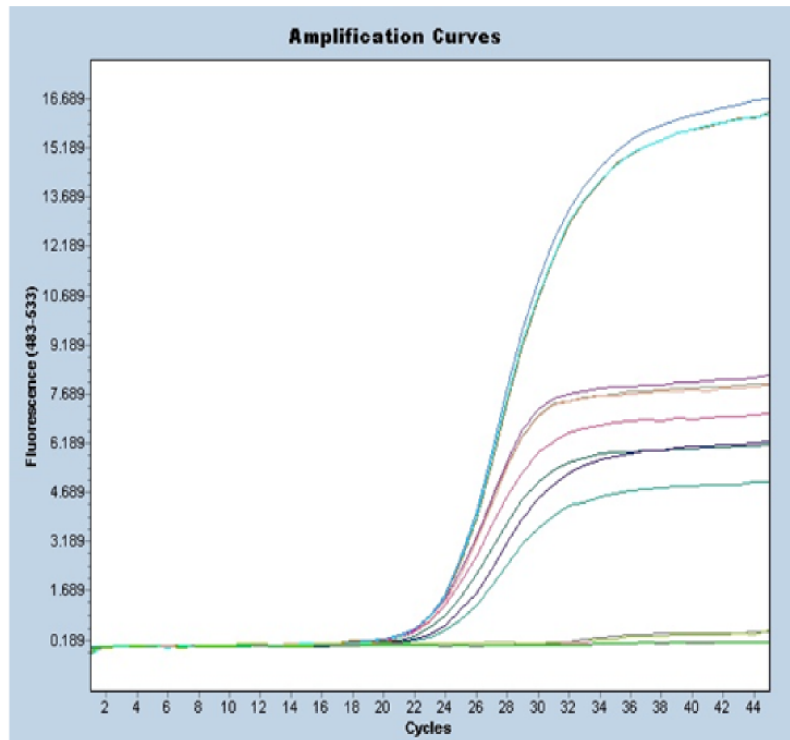


Abbildung 21: qPCR für MDM2 mit verschiedenen Kombinationen an Primerkonzentrationen. Dargestellt sind die Kombinationen an Primerkonzentrationen (Spalte 1) oder Wasser als Kontrolle und der erzielte Cp-Wert (Spalte 2). In diesem Fall ergab die Kombination 300nM Primer 1 und 900nM Primer 2 das beste Ergebnis. Vergleichbare Ergebnisse wurden in den Optimierungen der anderen Primer erreicht (s. Ergebnisstil).

## 2.5 Reinheitsmessung und Konzentrationsmessung im NanoDrop

Um für die nachfolgenden Reaktionen ähnliche Bedingungen zu schaffen, wurden die RNA-Konzentration der gewonnenen Proben mit Hilfe eines NanoDrop Fotometers bestimmt. Dabei wurde für die Messung 1µl der gereinigten RNA eingesetzt. Für das weitere Vorgehen wurden nur solchen RNAs eingesetzt, die eine Konzentration von mehr als 30ng/µl enthielten und deren Absorptionen bei 260nm und 280nm gemessen einen Quotient über 1.7 aufwiesen (Tabelle 9), weil in allen anderen Fällen die späteren RT-qPCR Messungen keine optimalen Ergebnisse lieferten. Daher wurden Proben, welche dieses Kriterium nicht erfüllten, wiederholt isoliert, falls noch Material vorrätig war.

$Q \frac{OD_{260nm}}{OD_{280nm}}$	Häufigkeit (n)	Häufigkeit (%)
< 1,8	33	26,2
> 1,8	93	73,8

Tabelle 9: Absorptionsquotienten der gewonnenen RNA Isolate. OD, optische Dichte.

In etwa 74% der Fälle wurde ein optimales Ergebnis ( $Q \frac{OD_{260nm}}{OD_{280nm}} > 1.8$ ) erreicht. Ursache für geringere Quotienten können neben den Verunreinigungen jedoch auch die unterschiedliche Zusammensetzung der verschiedenen RNAs haben, denn die verschiedenen Nukleotide zeigen unterschiedliche molare Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon$ ):

Adenin:  $\epsilon=4.50$ ; Cytosin:  $\epsilon=1.51$ ; Guanin:  $\epsilon=1.15$ ; Thymin:  $\epsilon=1.47$ ; Uracil:  $\epsilon=4.00$

Daher weisen GC reiche RNA-Abschnitte grundsätzlich niedrigere Absorptionswerte auf. Da hier jedoch Gesamt-RNA isoliert wurde, die zum großen Anteil aus rRNA besteht (~95%), sollten Unterschiede in der Basenzusammensetzung der mRNA nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der Unterschied der Absorptionskoeffizienten zwischen Uracil und Thimidin erklärt, warum RNA eine höhere und damit kleineren Konzentrationskoeffizienten als DNA hat [84].

Aufgrund der hohen Labilität von RNA wurden alle Arbeiten mit RNA schnell und auf Eis durchgeführt. Weiterhin wurde versucht, RNA so schnell wie möglich in die stabilere cDNA (*complementary* DNA) umzuwandeln. War dies nicht möglich, so wurde RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufgehoben. Weiterhin wurden RNA, Primer und anderen Reagenzien so aliquotiert, dass sie möglichst selten wiederholt aufgetaut werden mussten, um eine konstant hohe Qualität der Produkte zu garantieren.

## 2.6 miRNA Isolation

Die Isolation der miRNA erfolgte exakt nach der Beschreibung des Qiagen Handbuchs für miRNA Extraktion. (MiRNeasy Mini Kit Cat No./ID: 217004)

## 2.7 cDNA und ciDNA Synthese

Da DNA-Polymerase wie Taq-DNA-Polymerasen DNA als *template* benötigen, muss RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben werden. Für die cDNA Synthese wurde die RNAs auf 200 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt. Dafür wurden die im Nanodrop bestimmten RNA Konzentration mit Hilfe von Wasser auf diese gewünschte Zielkonzentration gebracht. 11,5 $\mu\text{l}$  der so verdünnten RNA wurden mit 1 $\mu\text{l}$  Random-Hexamer-Primer (Thermo Fisher) versetzt und für 5 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert und

anschließend auf Eis gelagert. Danach wurden in der angegebenen Reihenfolge folgende Agenzien zugegeben:

4 µl 5x Reaction Buffer

0,5µl RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher)

2µl dNTP Mix (10mM) (Thermo Fisher)

1µl RevertAid Reverse Transcriptase ((Thermo Fisher)

Die fertigen Reaktionsansätze wurden in ein PCR Gerät (Eppendorf, Mastercycler Pro) gestellt und nach folgendem Programm inkubiert: 10 min 25°C; 60 min 42°C; 10 min 70°C; Abkühlen auf 4°C. Schließlich wurde die fertige cDNA im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

miRNA wurden mittels Universal cDNA Synthesis Kit II umgeschrieben. Hierbei wurde das Protokoll [85] des Herstellers Exiqon genau eingehalten.

### 2.7.1 Quantitative Realtime PCR

Um die Expressionsmenge eines Gens zu bestimmen, müssen quantitative Verfahren eingesetzt werden. Zum Nachweis spezifischer Transkripte in einer RNA-Präparation werden quantitative *real-time*-PCRs (qPCR) verwendet. In qPCRs erfolgt der Nachweis der Menge an PCR-Produkt als Ausdruck der ursprüngliche eingesetzten Menge an cDNA nach jedem PCR-Zyklus, also parallel zur Amplifikation, weshalb diese Verfahren als *real-time* bezeichnet wird. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein *LightCycler T480* (Roche Diagnostics) *real-time* PCR Gerät eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Plattengerät mit 96 Messpositionen. Während der Elongation werden durch die 5'→3' Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase an die DNA gebundene Sonden (UPL, *universal probe library*) abgebaut und dadurch Fluorochrome und *quencher* (BHQ, *black hole quencher*) voneinander entkoppelt. Durch das anregende Licht einer Halogenlampe werden die Fluorochrome zur Fluoreszenz angeregt. Sind Fluorochrome und *quencher* in der Sonde gekoppelt, so wird das Fluoreszenzlicht des Fluorochromes durch den *quencher* gelöscht. Durch die Hydrolyse werden beide entkoppelt, sodass eine messbare Fluoreszenz entsteht. Das dabei entstehende

Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe eines CCD-Chips detektiert. Diese Ergebnisse werden geplottet (Abszisse: Zyklenzahl, Ordinate: Lichtintensität) und der Wendepunkt durch die Auswerte-Software bestimmt. Dieser wird als  $C_p$  (*critical point*) bezeichnet und ist proportional zur Menge der eingesetzten cDNA/ RNA Menge.

Die Analyse der cDNA (mRNA) als auch ciDNA (miRNA) erfolgte nach Labor-SOPs. Dabei wurden die Primer nach den Optimierungsergebnissen (Tabelle 12) eingesetzt.

## 2.8 Referenzgen- $\beta$ -Actin

Werden verschiedene RNA Isolate miteinander verglichen, so entstehen allein durch die Unterschiede in der Größe der isolierten Gewebeareale oder der Qualität der RNA unterschiedliche Ergebnisse in der qPCR. Dadurch lassen sich diese nicht direkt vergleichen, was jedoch das eigentliche Ziel ist. Um einen Vergleich zu ermöglichen, benötigt man einen Standard, auf den sich die Werte relativ normieren lassen. Zu diesem Zweck werden Referenzgene eingesetzt. Bei einem Referenzgen handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Gen, weshalb Referenzgene auch als *housekeeping*-Gen bezeichnet werden. Referenzgene weisen unter allen getesteten Bedingungen konstante Kopienzahlen pro Zelle auf. In diesen vorliegenden Untersuchungen wurde die  $\beta$ -Aktin mRNA als Referenzgen eingesetzt.  $\beta$ -Aktin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts, das auch Aufgaben in der Zellbewegung, Struktur und Integrität hat.  $\beta$ -Aktin wird sowohl in Tumorzellen als auch in Normalgeweben gleichermaßen exprimiert. Für den Vergleich der Expressionen eines Zielgens (GOI, *gene of interest*) in verschiedenen Ansätzen wird die relative Expressionsmenge des GOI ( $GOI_{rel}$ ) bezogen auf die Menge des Referenzgens bestimmt:

$$GOI_{rel} = \frac{Menge\ RNA\ GOI}{Menge\ RNA\ \beta-Aktin}$$

Auf diese Weise können Inhomogenitäten in der RNA Menge – oder Qualität im Ausgangsmaterial ausgeglichen werden. Da es sich bei den  $C_p$ -Werten um logarithmische Werte handelt, können diese Werte auch voneinander abgezogen werden, um den korrigierten  $C_p$ -Wert ( $C_p^{cor} = \Delta$ ) zu erhalten:

$$\Delta = C_p^{GOI} - C_p^{\beta-Aktin}$$

## 2.9 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mittels SPSS- Software (IBM SPSS Statistics 22) durchgeführt. Die Ergebnisse aus den qPCRs wurden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert. Dabei wurde der Median als Differenzierungspunkt zwischen niedrigen und hohen Konzentrationen zur Bestimmung des Schwellenwerts (*cut off*) eingesetzt. Überlebenskurven und PFS wurden mittels Kaplan- Meier- Modellierung berechnet. Dabei diente der Log- Rank Test als Differenzierungsinstanz. Ein Zusammenhang wurde als signifikant gewertet, wenn der  $\alpha$ -Fehler beidseits kleiner als 0,5 war.

### III. Ergebnisse

#### 1. Prüfung experimenteller Voraussetzungen

##### 1.1 Das gewählte Patientenkollektiv ist repräsentativ für die gesamte Intent-to-treat-Population der FIRE-1 Studie

Wie im Unterpunkt „Studienkollektiv“ im Material & Methoden Teil bereits angesprochen, stellte das gewählte Kollektiv lediglich einen kleinen Teil der FIRE-1 Studie dar, weil durch voran gegangene Studien bereits große Mengen an Gewebe verbraucht worden waren. So standen von ursprünglich 479 Patientenproben nur noch 118 (24.6%) zur Verfügung. Um trotz dieser niedrigen Fallzahlen die Validität in Bezug auf das Gesamtkollektiv zu wahren, wurden die beiden Kollektive miteinander verglichen. Zunächst zeigte sich, dass die Patientenzahlen in beiden Armen etwa die gleiche Stärke hatten (FUFIRI; 62; mIROX: 56). Anschließend wurde geprüft, ob die Effektivitätsparameter der Chemotherapie vergleichbar waren (Tabelle 10). Im Rahmen der FIRE-1 Studie wurden nur Patienten mit bidimensional messbaren Tumorerläsionen (mindestens 20 x 20mm) eingeschlossen. Das Ansprechen auf die Behandlung (ORR, *overall response rate*) wurde nach WHO-Kriterien bestimmt. Als komplette Remission (CR, *complete remission*) wurde die vollständige Rückbildung aller messbaren Tumormanifestationen, dokumentiert durch zwei mindestens vier Wochen auseinanderliegende Kontrolluntersuchungen, gewertet. Partielle Remission (PR, *partial remission*) wurde als Größenabnahme der Summe der Flächenmaße (Produkt der beiden größten Tumordurchmesser) aller messbaren Tumorerbefunde oder weniger als hälfiligen Größenreduktion bei linearer Messung eindimensional messbarer Erläsionen um mehr als 50% für mindestens vier Wochen, ohne Neuaufreten von Tumormanifestationen und ohne Progression irgendeines Tumorerbefundes gewertet. Eine stabile Erkrankung (SD, *stable disease*) wurde definiert, wenn keine Größenänderung der Tumorparameter für mindestens vier Wochen, oder eine Tumorreduktion um weniger als 50%, oder eine Größenzunahme um weniger als 25%, ohne Auftreten neuer Metastasen gefunden wurden. Eine progrediente Erkrankung (PD, *progressive disease*) lag bei Auftreten neuer Tumorerläsionen oder bei mehr als 25%iger Größenzunahme der Tumordimensionen in einem oder mehreren Herden vor.

Von der Stichprobe aus 118 randomisierten Patienten der FIRE-Studie konnte bei 103 Patienten (87.3%) eine Bewertung des Ansprechens der Therapie vorgenommen werden. Bei den fehlenden 15 Patienten wurde eine Bewertung entweder nicht durchgeführt oder die Patienten waren vor Evaluation des Ansprechens unter Therapie verstorben.

Bestes Ansprechen auf die First-Line Therapie	FUFIRI n=62		Vergleichswerte FIRE1	miROX n=56		Vergleichswerte FIRE1
	n=	%	%	n=	%	%
1 Komplette Remission (CR)	2	3,2	8	6	10,7	8
2 Partielle Remission (PR)	26	41,9	33	14	25	33
→ Gesamtes Ansprechen (CR+PR)	28	45,1	41	20	35,7	41
3 Stabile Erkrankung (SD)	26	41,9	40	15	26,8	27
→ Kontrolle der Erkrankung (CR + PR + SD)	54	87	81	35	62,5	68
4 Progress der Erkrankung (PD)	4	6,5	8	10	17,9	15
9 unbekannt / nicht möglich	4	6,5	11	11	19,6	17

**Tabelle 10:** Darstellung des Ansprechens in den jeweiligen Therapiearmen, mit Vergleich zu den Originaldaten der FIRE1 Studie[81]

Eine komplette Remission (CR) wurde bei 2 Patienten im FUFIRI-Arm und bei 6 Patienten im miROX-Arm erreicht. Bei jeweils 26 Patienten im FUFIRI- und 14 Patienten im miROX-Arm konnte eine partielle Remission (PR) gezeigt werden. Eine stabile Erkrankung (SD) wurde in insgesamt 41 Fällen festgestellt, davon 26 im FUFIRI-Arm und 15 im miROX-Arm, die sich damit signifikant unterscheiden. Gesamtes Ansprechen, definiert als komplette- (CR) und partielle Remission (PR) wurden in 28 Fällen (45,1%) im FUFIRI-Arm und 20 Fällen (35,7%) im miROX-Arm gezeigt gefunden. Eine Kontrolle der Erkrankung durch die Therapie, d.h. komplette Remission (CR), partielle Remission (PR) und stabile Erkrankung (SD) zusammengekommen, wurde bei 54 Patienten (87%) des FUFIRI-Arms und 35 Patienten (62,5%) des miROX-Arms erreicht. Ein Progress der Erkrankung (PD) trat im miROX-Arm bei 4 Patienten (6,5%) und im FUFIRI-Arm bei 10 Patienten (17,9%) auf. Die Evaluation des Ansprechens war bei vier (FUFIRI) vs. 11 Patienten (miROX) nicht möglich. Die ORR der beiden Therapielinien (Diagramm 1), hier als Gesamtansprechen definiert, unterscheiden sich mit 48,3 % unter FUFIRI und 44,4% unter miROX Therapie nicht signifikant voneinander ( $p=0,699$ ).

Die Ergebniss passt zu den Ergebnissen der vollständigen FIRE-1 Studie, in der beide eine Ansprechrate von 41% erreichten. Ebenfalls zeigt sich, dass die Gruppen der Patienten, die auf die Chemotherapie ansprechen in beiden Armen der FIRE-1 Studie vergleichbar waren (Diagramm 1).

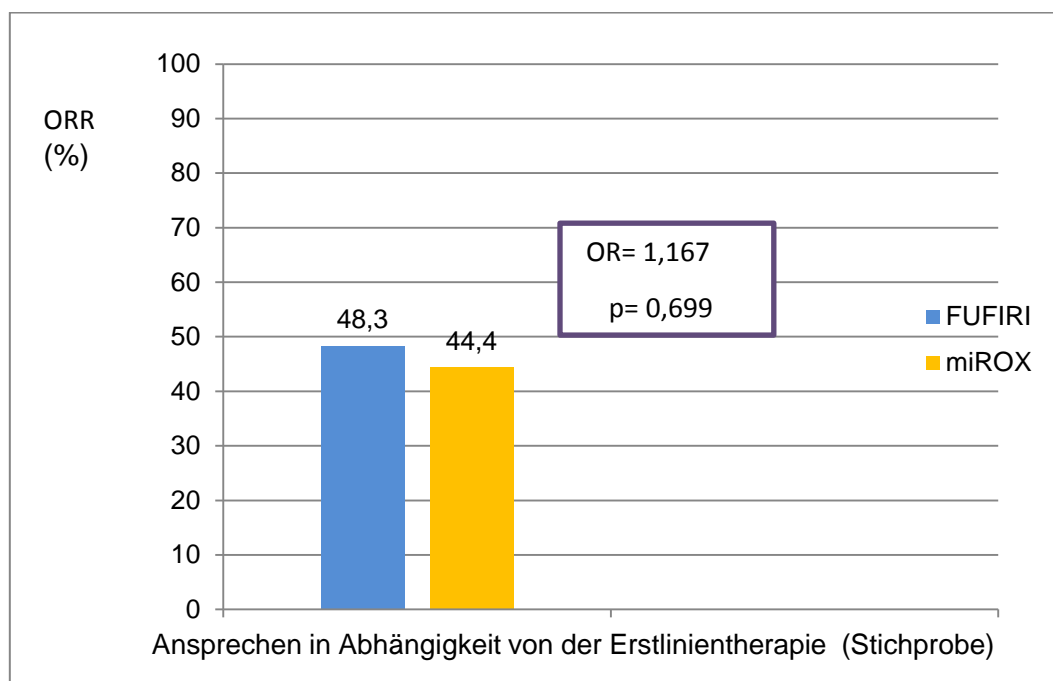


Diagramm 1: Ansprechraten des Patienten des eingesetzten Teilkollektivs der FIRE-1 Studie.

Insgesamt bildeten sich die klinischen Parameter der Teilgruppe der FIRE-1 Patienten hervorragend auf das FIRE-1 Kollektiv ab. Der Vergleich des Teilkollektivs mit dem Gesamtkollektiv mit sehr ähnlichen Resultaten spricht für die Repräsentativität des verwendeten Kollektivs. Somit war es valide, das FIRE-1 Teilkollektiv für die vorliegende Studie einzusetzen.

## 1.2 Immunhistochemische Expression von p53 korrelierte mit dem Vorliegen von Mutationen (*Next Generation Sequencing*)

In einem nächsten Schritt wurde getestet, inwiefern immunhistochemische Positivität der Expression des Tumorsuppressors TP53 mit genetisch bestätigten Mutationen korrelierte. Das Studienkollektiv umfasst 118 Tumorproben. Für jede dieser Proben konnte eine TP53 spezifische immunhistochemische Färbung durchgeführt werden. Als immunhistochemisch positiv, wurden diejenigen Fälle gewertet, welche eine übermäßig intensive Färbung von



mindestens 70% des Tumorgewebes zeigten, was auf 50 Fälle (42.4%) zutraf. Die verbleibenden 68 Fälle (57.6%) wurden als immunhistochemisch negativ bewertet.

Der Mutationsstatus des p53-Gens wurde mit Hilfe der NGS (*next generation sequencing*) Technik in einer Kooperation mit Prof. Dr. Reinhold Schäfer (Pathologisches Institut, Charité Berlin) bestimmt. Insgesamt gab es für 63 Patienten (53.4%) des hier untersuchten Teilkollektivs der FIRE-1 Studien evaluierbare Ergebnisse. In der NGS-Analyse wurden 20 Fälle als WT (32%) und 43 als mutiert eingestuft (68 %). Dabei stimmten die Ergebnisse der NGS Analyse hochsignifikant mit den Daten aus der Immunhistochemie überein ( $p = 0,003$ ). So waren 90% der in den NGS Daten als mutiert analysierten Fälle auch in den IHC basierten Analysen als mutiert/ positiv eingestuft worden (Tabelle 11). Der negativ prädiktive Wert war mit 71% allerdings deutlich niedriger (Tabelle 11).

	IHC positiv	IHC negativ
NGS MUT	42,9 %	4,8 %
NGS WT	15,3 %	37 %

**Tabelle 11: IHC- NGS Kreuztabelle. Positiv prädiktiver Wert der IHC-Analyse: 90%. Negativ prädiktiver Wert der IHC-Analyse: 71%**

Daher wurden im Folgenden für die Bestimmung des Mutationszustands die Ergebnisse aus der Immunhistochemie eingesetzt insbesondere, da diese für alle 118 Proben vorlagen. Dabei wurden die immunhistochemisch positiven Ergebnisse als Mutation gewertet, was mit einer hohen Sicherheit verbunden war. Für weitere Analysen könnte der *cut-off* Wert zwischen immunhistochemischer Negativität und Positivität niedriger gewählt werden, um somit den negativ prädiktiven Wert zu erhöhen.

### 1.3 Ergebnisse der Primeroptimierung

In einem dritten Schritt wurden nun die Primer für den Nachweis der Gene (mRNA) und miRNA optimiert, um auf diese Weise die beste Möglichkeit der Messung der Analyten zu erreichen und damit auf diese Weise eine optimale Auswertung der Ergebnisse zu erzielen.

Gen	Primer ( <i>forward</i> )			Primer ( <i>reverse</i> )			Länge PCR [bp]	# UPL probe
	Lab- ID	Sequenz	Konz. [nM]	Lab- ID	Sequenz	Konz. [nM]		
NANOG	A3170	ATGCCTCACACGGAGACTGT	900	A3171	CAGGGCTGTCCTGAATAAGC	900	67	69
SOX2	A2513	TGCTGCCTCTTAAGACTAGGAC	300	A2514	CCTGGGGCTCAAACCTCTCT	300	75	35
p21	A2251	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC	900	A2252	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	900	127	32
IGF1R	A3156	TTCAGCGCTGCTGATGTG	300	A3157	AAGTTCCCGCTCATGGT	300	75	7
p27	A3154	GCACTGAAAAACAACAACAAT	300	A3155	TGCATAATGCTACATCCAACG	900	88	34
p57	A3166	GAGCGAGCTAGCCAGCAG	300	A3167	GCGACAAGACGCTCCATC	900	121	77
BCL2	A3162	AGCCTTGATCCAGGAGAA	300	A3163	AGCGGTTGAAGCGTTCCT	300	102	66
LMNB2	A3164	GGCTCCTGCTCAAGATCTCA	900	A3165	GACTCGTACAGCGCCTTGAT	900	76	63
MDM2	A3152	GACTCCAAGCGCGAAAAC	300	A3153	GGTGGTTACAGCACCATCAGT	900	89	68
PTEN	A3158	GCACAAGAGGCCCTAGATTTC	300	A3159	CGCCTCTGACTGGGAATAGT	300	77	60
STMN1	A3148	TGCTCTGTCCGAGTGCTG	300	A3149	GCACAATCAACTGGGATAAGG	300	109	39

Tabelle 12: Charakterisierung der eingesetzten Primer für qPCR

Zusammenfassend standen an diesem Punkt der Untersuchung

- ein repräsentatives zweiarmiges (FUFIRI vs. mIROX) Studien-Kollektiv an Patienten
- Information zum Mutationszustand des p53-Gens in Form einer surrogaten Immunhistochemie,
- RT-qPCR Systems zur Messung von ❶ miRNA des TP53-Netzwerks (miRNA-22,- 34, -192, - 215, -221 und -223) und ❷ deren *target* Gene BCL2, MDM2, p21, p27, p57, PTEN sowie IGF-1R

zur Verfügung. Auf dem Boden dieser optimalen Bedingungen konnte nun die eigentliche Testung der Arbeitshypothese erfolgen.

## 2. Kanzerogenese und Tumorbologie

In einem ersten Schritt wurden die relativen Expressionsmengen der miRNA bestimmt. Dazu wurde aus den RNA-Isolaten durch reverse Transkription cDNA und diese in Triplikaten in qPCRs eingesetzt. Alle der sechs untersuchten miRNAs-22,- 34, -192, - 215, -221 und -223 zeigten ein verwertbares Messergebnis (Tab.13). Dabei zeigte die Bestimmung der Messung

der miRNA-34 Ausreißer, die jedoch nicht in die Analyse eingingen, sodass für die Bestimmung der Expression von miRNA nur 104 Fälle berücksichtigt werden konnten.

miRNA	Mittelwert	+/-SD
22	32,04	0,89
34	30,44	1,52
192	30,08	2,79
215	30,85	2,78
221	31,15	2,18
223	31,12	2,05

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten miRNA

## 2.1 miRNA-192 und -215 finden sich in p53 mutierten Tumorproben niedriger exprimiert

Nach Vorliegen des Mutationsstatus des p53-Gen/ TP53 und der Expressionsstärke einiger TP53 regulierter miRNAs konnte nun ein Zusammenhang zwischen diesen Größen hergestellt werden. Dabei ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der beiden miRNA-192 ( $p = 0,016$ ) und miRNA-215 ( $p=0,013$ ) und geringer immunhistochemischer Expression von TP53 bzw. p53 WT (Diagramm 2). Somit scheinen diese beiden miRNA in einer besonderen Weise von der Regulation durch TP53 abzuhängen, denn auch die anderen untersuchten miRNA weisen zwar alle TP53 Bindungsstellen in ihren Promoter/ Enhancer Bereichen auf, doch scheint die Expression hier auch durch andere Signalwege reguliert zu werden, sodass der Ausfall der Expression bzw. Mutation im p53 Gen keinen großen Effekt zeigt. Für miRNA-22 ( $p = 0,709$ ), miRNA-34 ( $p = 0,709$ ) und miRNA-223 ( $p = 0,448$ ) wurde kein vergleichbarer Zusammenhang gefunden.

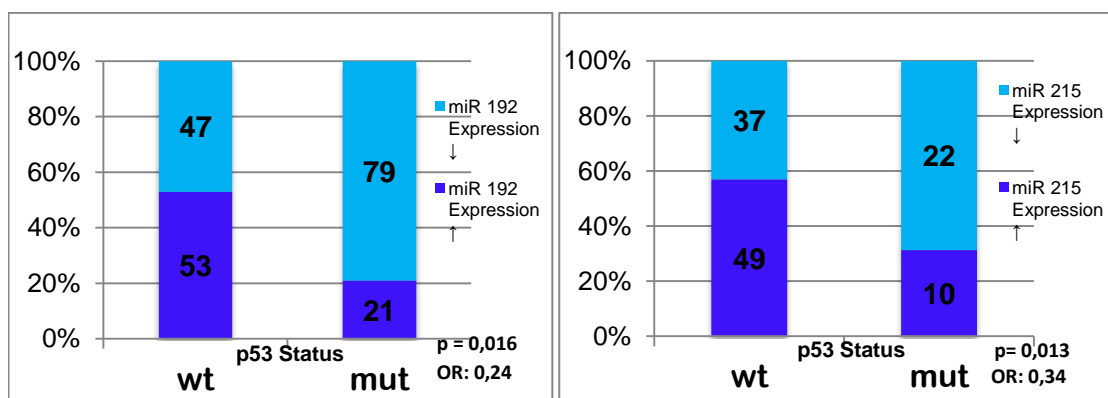


Diagramm 2: miRNA-192 und -215 Expression in Abhängigkeit von p53

## 2.2 Korrelation von miRNA mit möglichen Zielgenen

Zur Validierung der Ergebnisse der miRNA Expression wurde geprüft, ob sich ein Zusammenhang zwischen der Expression einiger der Zielgene der miRNAs mit ihrer Expression zeigte. Dazu wurde analog zur Expression der miRNA die Expressionsstärken der mRNAs der Gene BCL2, MDM2, p21, p27, p57, PTEN sowie IGF-1R mit Hilfe von RT-qPCRs bestimmt. Dabei wurde als *cut off* Wert der Median der Expressionsstärken eingesetzt und mit der Expression der zuvor bereits gemessenen miRNA sowie dem TP53 Expressionsstatus (p53 Mutationsstatus) korreliert (Tabelle 14).

miRNA	Expression des Zielgens	Zielgen (mRNA)	p- Wert	Zusammenhang mit	
				mit P53-WT	mit P53-MUT
22	erhöht	p57	0,017	-	0,025
	erhöht	MDM2	0,000	0,05	0,002
	erhöht	NANOG	0,006	-	0,002
	erhöht	PTEN	< 0,001	0,008	0,001
34	erhöht	p21	0,017	0,017	-
	senkt	IGF1R	0,033	0,018	-
	senkt	BCL2	0,026	-	-
192	erhöht	MDM2	0,03	0,004	-
	senkt	IGF1R	0,013	0,05	-
	erhöht	PTEN	0,004	0,009	-
	erhöht	p21	0,038	0,007	-
215	erhöht	MDM2	0,043	-	-
	senkt	IGF1R	0,033	-	-
	erhöht	PTEN	0,000	0,016	0,012
	erhöht	p21	-	0,05	-
221	senkt	p57	0,04	-	-
	senkt	p21	0,045	-	-
	erhöht	SOX2	0,01	-	-
	senkt	IGF1R	0,016	0,01	-
223	Senkt	IGF1R	0,036	0,026	-
	Senkt	BCL2	0,035	-	0,05

**Tabelle 14: Signifikante miRNA- Gen Wechselbeziehungen.** Die Tabelle enthält nur signifikante Ergebnisse. Weder nicht signifikante Werte noch fehlenden Zusammenhänge wurden in der Darstellung berücksichtigt.

Diese Ergebnisse spiegeln die Erwartungen wider und bestätigen als unabhängiges Validierungsmerkmal, dass die Messungen der miRNA richtig waren. Denn die hier gefundenen Beziehungen finden sich in der Literatur bestätigt.

Durch den aufgezeigten Zusammenhang zwischen der Expression einiger TP53 regulierter miRNA mit dem Mutations- bzw. Expressionsstatus von TP53/ p53, der durch den erwarteten Zusammenhang zwischen der Expression der miRNA-22, -34, -192, -215, -221 und -223 mit den *target* Genen BCL2, MDM2, p21, p27, p57, PTEN sowie IGF-1R validiert werden konnte, wurde die Idee der Rolle eines komplexen TP53 Netzwerks teilweise unterstützt. Um nun einen Zusammenhang mit der Effektivität einer Chemotherapie aufzeigen zu können, wurde untersucht, ob auch eine statistische Korrelation zwischen miRNA Expression und den Effektivitätsparametern der Chemotherapie bestand.

### **3. Prädiktive Faktoren für Chemotherapie Effektivität**

#### **3.1 p53 Genmutation oder TP53 Überexpression korrelieren nicht mit den Effektivitätsparametern für Chemotherapie**

Im ersten Teilaspekt wurde untersucht welche Rolle die Expression von TP53 bzw. Mutation des p53-Gens als Prädiktor für das Ansprechen auf Chemotherapie haben könnte. Diese Untersuchung war von besonderem Interesse, weil es in der Literatur bereits eine Vielzahl an Publikationen gibt, die einen Zusammenhang zwischen dem Mutationszustand des p53 Gens und dem Ansprechen auf Chemotherapie zeigten. Allerdings lieferten diese Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse, sodass der Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf Chemotherapie und Mutation des p53-Gens fraglich blieb [43, 44].

Da in dieser Studie ein ausgezeichnetes Kollektiv an Patienten aus einer randomisierten klinischen Studie mit einheitlichem Patientenkollektiv durch Kontrolle der Zugangsparameter vorlag, wurde auch hier der Zusammenhang zwischen Mutation des p53 Gens bzw. der Expression des TP53 Proteins mit den Parametern PFS, OS und ORR korreliert. Dazu wurden Student-t Tests eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Expression von TP53 bzw. eine Mutation im p53-Gen keinen Zusammenhang zu einem der drei untersuchten Parametern PFS, OS oder ORR aufwies und somit keinen prädiktiven Werte haben sollte (Tabelle 14). Lediglich zwischen ORR und p53 Mutationen in der FUFIRI-Subgruppe konnte ein Trend ( $p=0.064$ , Tab 14, ②) berechnet werden. Daher könnte es von Vorteil sein, diesen Zusammenhang in einem größeren Kollektiv zu untersuchen (Halbierung des p-Werts durch Verdopplung der Untersuchungskohorte).

Korrelation von p53 Mutationen/ TP53 Expression mit Effektivitätsparametern in der:**① Gesamtgruppe**

	<b>p53 Status</b>	<b>ORR (%)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OS (m)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>PFS (m)</b>	<b>p-Wert</b>
Gesamt	Wildtyp	40,4	0,157	22,7	0,749	9,8	0,503
	Mutiert	54,3		24,4		11,6	

**② Subgruppe mit FUFIRI Therapie**

	<b>P53 Status</b>	<b>ORR (%)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OS (m)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>PFS (m)</b>	<b>p-Wert</b>
FUFIRI	Wildtyp	35,7	<b>0,064</b>	22,5	0,893	10	0,199
	Mutiert	60		24,7		14,1	

**③ Subgruppe mit mIROX Therapie**

	<b>P53 Status</b>	<b>ORR (%)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OS (m)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>PFS (m)</b>	<b>p-Wert</b>
mIROX	Wildtyp	44,8	0,944	23,1	0,875	9,8	0,284
	Mutiert	43,8		21,8		7,1	

Tabelle 15: Einfluss von p53 auf ORR, PFS und OS

Diese Ergebnisse zeigten erneut auf, dass der Zusammenhang zwischen p53 Genmutationen und Ansprechen nicht linear, also einfacher Natur sein kann.

### 3.2 miRNA Expressionswerte korrelieren mit Therapieansprechen

Daher wurde in einem nächsten Schritt das Untersuchungsprinzip auf die Expression der miRNAs übertragen, da diese die Komplexität des TP53-Netzwerks in sich tragen (Tabelle 15).

miRNA	Therapie	ORR %	p- Wert	PFS m	p- Wert	OS m	p- Wert
miR 22 ↓ ↑	FUFIRI	88,6 85,2	0,693	11,0 12,5	0,718	21,9 25,9	0,392
miR 22 ↓ ↑	mIROX	70,8 56,3	0,265	8,9 9,2	0,773	21,6 24,2	0,552
miR 34 ↓ ↑	FUFIRI	90 88,5	0,835	11,3 12,3	0,934	26,5 20,7	0,169
miR 34 ↓ ↑	mIROX	55,6 16,7	0,034	11,1 6,1	0,01	27,2 14,3	0,004
miR192 ↓ ↑	FUFIRI	96,8 78,9	0,041	14,6 7,2	0,03	29,5 16,5	0,001
miR192 ↓ ↑	mIROX	75 36,8	0,012	9,9 6,2	0,029	26,2 17,4	0,102
miR215 ↓ ↑	FUFIRI	96,8 77,4	0,023	14,2 9,5	0,126	27,2 19,7	0,05
miR215 ↓ ↑	mIROX	60,7 64,3	0,783	9,2 8,2	0,371	23,2 22,6	1
miR221 ↓ ↑	FUFIRI	87,1 84,0	0,742	13,1 9,2	0,141	20,4 26,7	0,182
miR221 ↓ ↑	mIROX	48 76,5	0,065	8,3 10,2	0,631	20,2 26,5	0,105
miR223 ↓ ↑	FUFIRI	61,3 33,3	0,034	12,7 10	0,163	25,7 22,3	0,424
miR223 ↓ ↑	mIROX	56,5 65,2	0,546	10,3 7,7	0,07	21,2 26,9	0,186

Tabelle 16: Effektivitätsparameter bei FUFIRI oder mIROX Therapie in Abhängigkeit der miRNA Konzentration.

Niedrige oder hohe miRNA Konstellationen, sind mit Pfeilen indiziert. Zum einfachen Auffinden sind statistisch signifikante Wechselbeziehungen farbig unterlegt.

Zusammenfassend zeigten sich statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der Expressionsstärke von:

- miRNA-34 ( $p=0.034$ ) und miRNA-192 ( $p=0.012$ ) auf mIROX
- miRNA-192 ( $p=0.041$ ), miRNA215 ( $p=0.023$ ) und miRNA-223 ( $p=0.034$ ) auf FUFIRI Therapie (Diagramm 3).

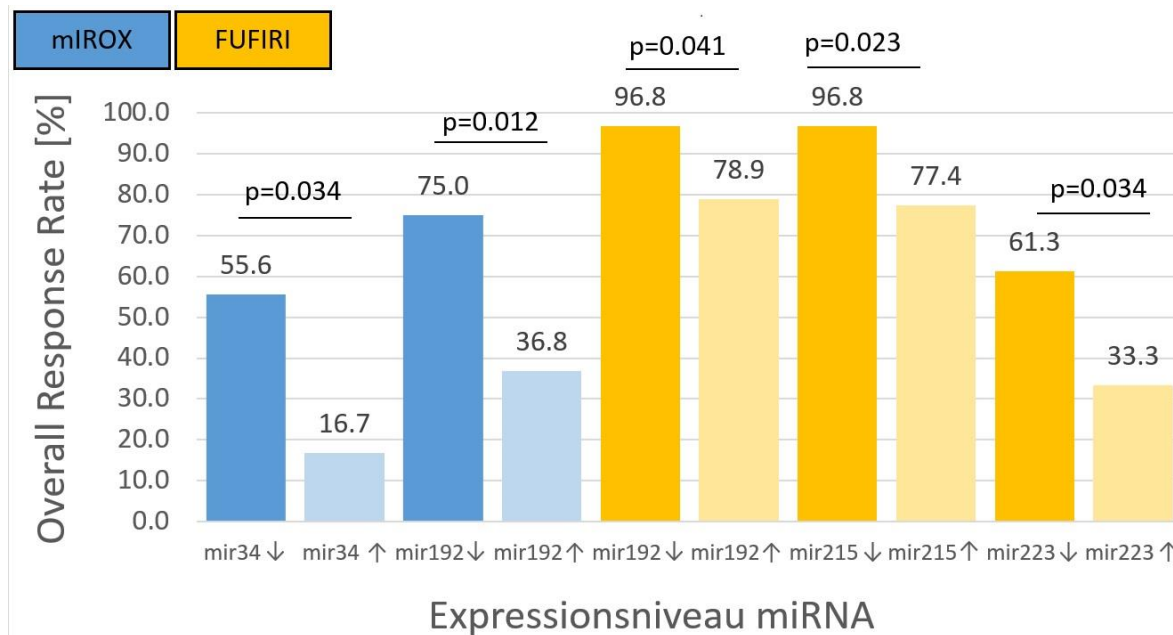


Diagramm 3: Die Expressionsstärken einiger TP53 regulierter miRNA korrelieren mit dem Ansprechen (ORR, overall response rate) auf Chemotherapie.

Analog fanden sich klare Zusammenhänge zwischen dem Gesamtüberleben (OS, *overall survival*) bei **FUFIRI Therapie** und der Expression der

- miR-192↓: 29.5 m (CI: 23,4-35,6), miR-192↑: 16.5 m (CI: 13,7-20,2);  $p=0.001$  (Diagramm 4A)
- miR-215↓: 27.2 m (CI: 20,9-33,6), miR-215↑: 19.8 m (CI: 16,0-23,5);  $p=0.05$  (Diagramm 4B)

bei **mIROX Therapie** und der Expression der

- miR-34↓: 27.2 m (CI: 22,8-29,7), ↑ 14.3 m (CI: 12,1-18,5;  $p=0.004$  (Diagramm 4C)



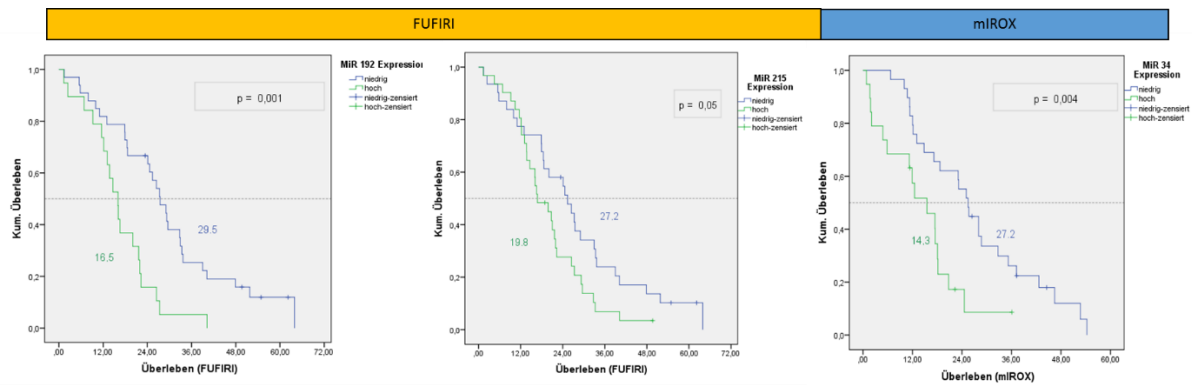


Diagramm 4: Gesamtüberleben (OS, overall survival) bei FUFIRI oder mIROX Therapie in Abhängigkeit der miRNA Expressionsstärke.

Für das progressionsfreie Überleben (PFS, *progression free survival*) bei **FUFIRI Therapie** bestand ein Zusammenhang zur Expression von:

- miR-192↓: 14.6 m (CI: 9,0-20,2); miR-192↑: 7.2 m (CI: 5,9-9,3); p=0.03 (Diagramm 5A)

und bei **mIROX Therapie** mit der Expression der

- miR-34↓: 11.1 m (CI: 8,4-13,9); miR-34↑: 6.1 m (CI: 4,0-8,3); p=0.01 (Diagramm 5B)
- miR-192↓: 9.9 m (CI: 7,4-12,3); miR-192↑: 6.2 m (CI: 4,9-8,0); p=0.029 (Diagramm 5C)

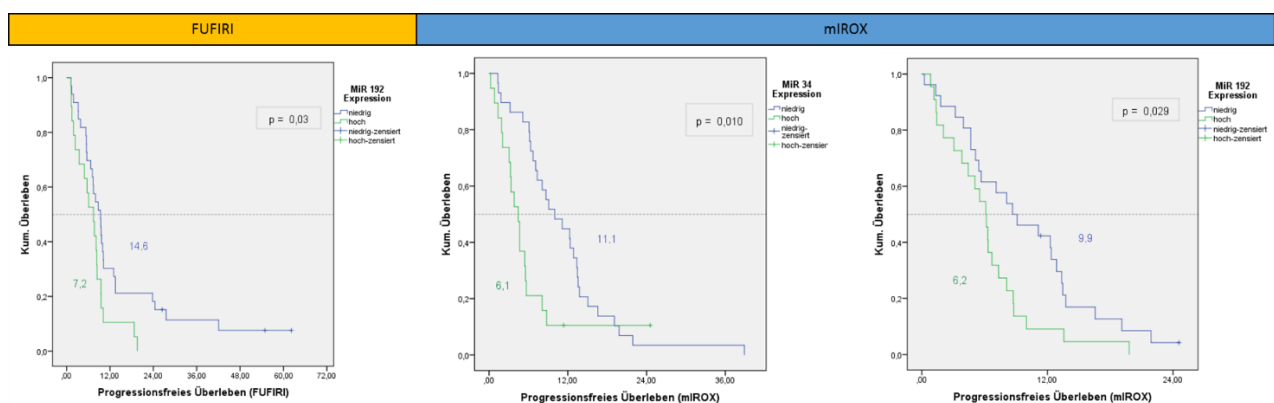


Diagramm 5: Progressionsfreies Überleben (PFS, *progression free survival*) bei FUFIRI oder mIROX Therapie in Abhängigkeit der miRNA Expressionsstärke.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass einige ausgewählte TP53 regulierte miRNAs eine mögliche Prädiktorfunktion für das Ansprechen auf Chemotherapie haben, obwohl sich

kein direkter Zusammenhang mit dem Ausfall der TP53 Funktion gemessen als Mutation des p53 Gens oder Überexpression des TP53 Gens zeigte. Dabei waren niedrige miRNA Werte im Regelfall mit besseren Effektivitätsparametern (ORR; OS, PFS) assoziiert. Sowohl ORR als auch PFS und OS stiegen bei niedriger Expression signifikant an. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass es spezielle miRNA- Therapie Wirkprofile gibt:

- miRNA-34 zeigte einen Zusammenhang auf miROX Therapie und könnte demnach als ein möglicher Prädiktor für Oxaliplatin-haltige Therapien fungieren.
- miRNA-215 wiederum zeigt eher bei FUFIRI, also 5- FU haltiger Therapie Wirkung.
- MiRNA-192 hat in beiden Therapiearmen signifikanten Einfluss und könnte vor diesem Hintergrund als Indikator für einen erfolgreicherer Verlauf einer Chemotherapie stehen.

## IV. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war darauf ausgerichtet, auf molekulargenetischer Ebene prädiktive Faktoren zu identifizieren, welche es ermöglichen, die Effektivität chemotherapeutischer Behandlungen vorherzusagen. Neben diesem vordergründigen und klinisch anwendbaren Ziel wurde jedoch auch getestet, inwieweit eine deduktiv gewonnene Modellbildung in der Lage ist, aus einer vergleichsweise kleinen Zahl an Patienten ein Ergebnis mit klinischer Relevanz zu liefern.

Aufgrund der Tatsache, dass die Wirkung der Chemotherapeutika über die Modulation von Proliferation und Apoptose erfolgt und TP53 ein zentraler Spieler in der Regulation dieser zellulären Funktionen (*hallmarks of cancer*) ist, wurden für die Suche nach prädiktiven Biomarkern solche Biomoleküle gewählt, welche eine entscheidende Rolle im TP53 Netzwerk einnehmen. Darunter befinden sich die im Fokus der Arbeit liegenden miRNAs aber auch Proteine bzw. mRNAs. Um einen Zusammenhang mit TP53 herzustellen, wurden miRNAs selektiert, die durch TP53 reguliert werden. Diese wurden dann in einen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Chemotherapie gestellt, das ein Ausdruck für die Wirkungseffizienz der Therapie darstellt.

Ein zweiter wichtiger Aspekt war der Einsatz von Proben aus einer randomisierten Studie. Denn durch den Aufbau einer Studie wird allein über die Selektion einer bestimmten Subgruppe an Patienten eine Vielzahl anderer klinischer Faktoren ausgeschlossen, die das Ergebnis beeinflussen könnten (*confounder*). Durch diese geringere intrinsische Streuung sollten Ergebnisse klarer und damit eindeutiger werden. Für die Analysen standen Tumorproben aus der randomisierten Phase III Erstlinientherapie FIRE-1 Studie zur Verfügung. FIRE-1 verglich in der Erstlinientherapie mIROX mit FUFIRI und erlaubt damit den Vergleich einer Fluoropyrimidin-basierten Kombination mit einer Oxaliplatin-basierten Chemotherapie, wobei der Platin-Arm 5-FU frei ist, was aus heutiger Sicht eine Besonderheit darstellt, da praktisch alle chemotherapeutischen Ansätze 5-FU enthalten. Auf diese Weise wurde es möglich, den Effekt von 5-FU näher zu beleuchten. Da Irinotecan in beiden Armen enthalten war, ist diesbezüglich keine differentielle Aussage möglich.

## 1. Qualitätssicherung

Vor dem Beginn der eigentlichen Messungen wurden die eingesetzten Techniken und das Patientenkollektiv auf Qualität geprüft. So sollte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse ein hohes Maß an Zuverlässigkeit zeigten. So wurden die RT-qPCR Bedingungen maximiert und diese als SOP (*standard operating procedure*) für die Messungen eingesetzt. Die Ergebnisse für den Mutationszustand des p53-Gens wurden in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Charité in Berlin durchgeführt (Prof. Dr. Reinhold Schäfer). Dieses Labor hat mit der NGS (*next generation sequencing*) Technik an einer Vielzahl an Qualitätssicherungsmaßnahmen (QuIP-Ringversuche, Qualitätssicherungs-Initiative in der Pathologie) teilgenommen und mit dieser Technik bereits einige Publikationen erarbeitet, sodass eine ausreichend hohe Qualität und damit Verlässlichkeit der Ergebnisse angenommen wurde. Schließlich wurde die FIRE-1 Studie intensiv untersucht, denn es stand nur noch Gewebe von einer kleinen Subkollektion an Fällen (119 von 479, 24.8%) zur Verfügung. Es wurde gezeigt, dass sich die Proben gleichmäßig auf die beiden Therapiearme verteilten und dass vor allem die Ansprechraten zwischen der gesamten FIRE-1 Studie und dem hier eingesetzten Teilkollektiv übereinstimmten. Daher wurde davon ausgegangen, dass das hier eingesetzte Teilkollektiv repräsentativ für die gesamte FIRE-1 Studie war und folglich für die weiteren Analysen eingesetzt werden konnte.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit mit qualitativ validierten Methoden und Material gearbeitet, sodass die Ergebnisse auf einer zuverlässigen Basis beruhen sollten.

## 2. p53 Mutationsanalyse: NGS Daten zeigen einen Zusammenhang mit Ergebnissen der Immunhistochemie

Nachdem in der Literatur eine ambivalente Lage zur Bedeutung des p53-Gens bzw. TP53 Proteins für Vermittlung von Chemoresistenz besteht [32, 41, 43], wurde diese Analyse noch einmal durchgeführt. Zunächst wurde geprüft, ob das Vorhandensein einer Mutation im p53-Gen mit dem immunhistochemischen Nachweis des TP53 Proteins kongruierte. Ein Kennzeichen von TP53 ist seine kurze Halbwertszeit, die im Bereich von 20 Minuten liegt. Diese kann zum einen durch Mutationen zum anderen durch Phosphorylierung im Rahmen einer physiologischen Aktivierung des p53-Signalwegs erfolgen.

Somit stellte sich die Frage, welcher Anteil des TP53 Nachweises mit Mutationen und welcher mit Aktivierung einherging, um zu untersuchen, ob ein immunhistochemischer Nachweis von TP53 als Surrogat für eine Mutation im p53-Gern herangezogen werden konnte. In der Literatur wird dieser Zusammenhang sehr kontrovers diskutiert. Hier zeigten Studien eine Übereinstimmung zwischen beiden methodischen Ansätzen zwischen 68% (100 Fälle)[86] und 70% (88 Fälle) [87]. Schwierigkeiten bestehen zum einen in der Vergleichbarkeit, indem die Mutationsnachweise unterschiedliche Sensitivitäten aufwiesen aber auch in der Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse Unterschiede bestanden, insbesondere weil die Abschätzung der Färbungsintensitäten und Fläche des analysierten Tumoreals nach unterschiedlichen Regeln erfolgte.

Aus den eigenen Daten ergab sich ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausfall des immunhistochemischen TP53 Nachweises und dem Vorliegen eines p53-Gens in WT-Konfiguration (NGS MUT~IHC +: 42.9%, NGS WT~IHC -: 37%, NGS MUT~IHC -: 4.8%, NGS WT~IHC+: 15.3%). Für die Analysen wurden daher die Ergebnisse aus den NGS Analysen eingeschlossen (50 Fälle) und die fehlenden mit den immunhistochemischen Ergebnissen aufgefüllt, sodass ein Fehler von 11,6 % vorlag, also insgesamt ein immer noch sicheres Ergebnis erzeugt werden konnte. Insgesamt zeigte sich, dass für eine genaue Aussage die genetische Analyse zu bevorzugen ist, denn immunhistochemische Positivität würde zwei diametral unterschiedliche Ergebnisse beinhalten. ❶ p53 Gen mutiert: keine transkriptionale Aktivität des TP53 Protein und damit Ausfall des TP53-Netzwerks. ❷ p53 Gen intakt: TP53 durch Phosphorylierung (ATM, ATR) aktiviert; hohe transkriptionelle Aktivität des TP53 Proteins und damit des TP53-Netzwerks. In weiteren Studien sollten daher alle Fälle tumorgenetisch untersucht werden, um den Zusammenhang zwischen IHC und NGS in einem größeren Kollektiv zu analysieren und damit eine noch höhere Aussagekraft der Ergebnisse zu schaffen. Zudem sollte der Fehler 1. Art, durch einen IHC- Auswertealgorithmus mit noch höherem richtig positivem Prozentsatz, verringert werden können.

### **3. p53 Mutation oder TP53 Überexpression zeigten keinen Zusammenhang mit Ansprechen auf Chemotherapie**

Die Korrelation zwischen p53-Mutation und TP53 Überexpression ergab in diesem Kollektiv keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Chemotherapie ( $p = 0,296$ ), was

durch zahlreiche Studien unterstützt wird [32, 43]. Dementsprechend scheint bei diesen Studien, die einen solchen Zusammenhang zeigen, ein konzeptioneller Fehler in der Untersuchung vorzuliegen. Dieser liegt meistens in der Auswahl des Patientenkollektivs und dem immunhistochemischen Auswertalgorithmus. Eine alternative Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass p53 Mutationen einen grenzwertigen Zusammenhang mit Ansprechen auf Chemotherapie zeigen und dadurch andere unbekannte Kofaktoren den Ausschlag für das Ergebnis liefern. In dem hier untersuchten FIRE-1 Kollektiv wurde lediglich ein Trend zwischen p53 Mutation und gutem Ansprechen auf FUFIRI Therapie gefunden ( $p = 0,064$ ).

Wie die Ergebnisse interpretiert werden, zeigt sich, dass p53 Mutationen bzw. eine Überexpression von TP53 kein geeigneter prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf Chemotherapien ist. Umgekehrt weist dieses grenzwertige Verhalten jedoch darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Ansprechen auf Chemotherapie und p53 bestehen kann, der aber nicht einfach linearer, sondern komplexer Natur ist. Auf dieser Basis entstand die Idee eines TP53-regulierten Netzwerks, in dem sich Biomarker finden lassen sollten, die einen Zusammenhang mit Ansprechen auf Chemotherapie zeigen.

#### **4. TP53 regulierte mRNA**

Für die Definition des TP53-Netzwerks wurden weniger Zielgene (mRNA) eingesetzt, sondern miRNAs, da diese eine Verbindung zwischen TP53 und anderen Signalwegen schaffen, also eine echte Vernetzung. miRNAs werden zudem oft über eine Vielzahl an anderen Signalwegen reguliert, sodass die transkriptionelle Abhängigkeit von TP53 mehr als Indikator oder Selektor für die potentielle Bedeutung der miRNA verstanden wurde. Ein direkter Zusammenhang zwischen Expression der miRNA und der Mutation des p53 Gens wurde daher nicht unbedingt erwartet.

Um das TP53-Netzwerk definieren und untersuchen zu können, wurden zunächst miRNA gesucht, die durch TP53 reguliert werden. Dazu wurde eine ausgiebige Literaturrecherche durchgeführt. miRNA, welche schon mit p53 in Zusammenhang gebracht worden waren oder solche, für welche in Studien ein Zusammenhang mit Therapieansprechen gezeigt werden konnte, wurden in das Modell des TP53 Netzwerks integriert, um dieses dann in der FIRE-1 Studie zu evaluieren. Insgesamt wurden die sechs miRNAs miRNA-22, miRNA-34, miRNA-192, miRNA-215, miRNA-221 und miRNA-223 untersucht, weil sie zum einen durch TP53

reguliert werden und zum anderen eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation und Apoptose einnehmen oder ein Zusammenhang mit Chemotherapie gezeigt werden konnte [55, 61, 65, 66]. Es zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikanter Zusammenhang zwischen miRNA-192, -215 und p53. p53 WT korrelierte mit einer hohen Expression dieser miRNAs, p53 MUT jedoch nicht, was durch Ergebnisse aus der Literatur unterstützt wird [53]. Umgekehrt zeigten die miRNA-34 und -223 keine Abhängigkeit vom p53 Mutationsstatus des Tumors. Im Gegensatz dazu wurde in Zellkulturen ein Zusammenhang zwischen miRNA-34 Expression und p53 WT beschrieben jedoch nicht für kolorektale Karzinome im Stadium IV [73]. Weiterhin zeigte sich bei Untersuchungen an Zelllinien [88], dass miRNA-223 im Falle eines mutierten p53 Gens weniger stark exprimiert wurde. Dieser Zusammenhang konnte in den hier untersuchten Proben aus Patientenmaterial nicht hergestellt werden.

Die hier präsentierten Ergebnisse aus dem Patientenmaterial fundieren auf einer festen Basis, denn neben den Messungen der miRNAs wurden auch deren Zielgene BCL2, MDM2, p21, p27, p57, PTEN und IGF-1R untersucht. Dabei zeigte sich der erwartete gegenläufige Zusammenhang zwischen der Expression der miRNAs und der zugehörigen Zielgene (Tab. 14). Dies kann als Plausibilitätskontrolle der Expression der miRNAs angesehen werden, wodurch die Güte der Messergebnisse erneut unter Beweis gestellt wurde.

## 5. Modell des p53 Netzwerkes

Die Zusammenhänge und die Ergebnisse werden im Folgenden näher erläutert und visualisiert (Abb. 22, 23). Dabei wird auch der Zusammenhang zwischen TP53, den miRNAs und Zielgenen genauer dargestellt, um die gewonnenen tumorbiologischen Erkenntnisse in einem Arbeitsmodell zu vereinen. Die beiden Betrachtungen unterscheiden sich im Mutationssatus des p53 Gens: WT (Abb.22) oder p53 MUT (Abb. 23).

In den folgenden Betrachtungen wird vor allem auf verschiedene proliferationsfördernde Signalwege sowie Apoptose eingegangen, da das Netzwerk gedanklich auf diese *hallmarks of cancer* entwickelt wurde. In den Modellen (Abb. 22, 23) ist ein möglicher Einfluss der regulatorischen miRNA auf die verschiedenen Proteine farblich markiert und mit Hilfe von Pfeilen als expressionsfördernd oder -hemmend gekennzeichnet. Die Modelle, p53WT und p53 MUT, zeigen auch miRNA-Zielgen-Beziehungen, welche in der Arbeit nicht untersucht worden sind, jedoch in der Literatur beschrieben wurden und das Gesamtbild vervollständigen helfen sollen.

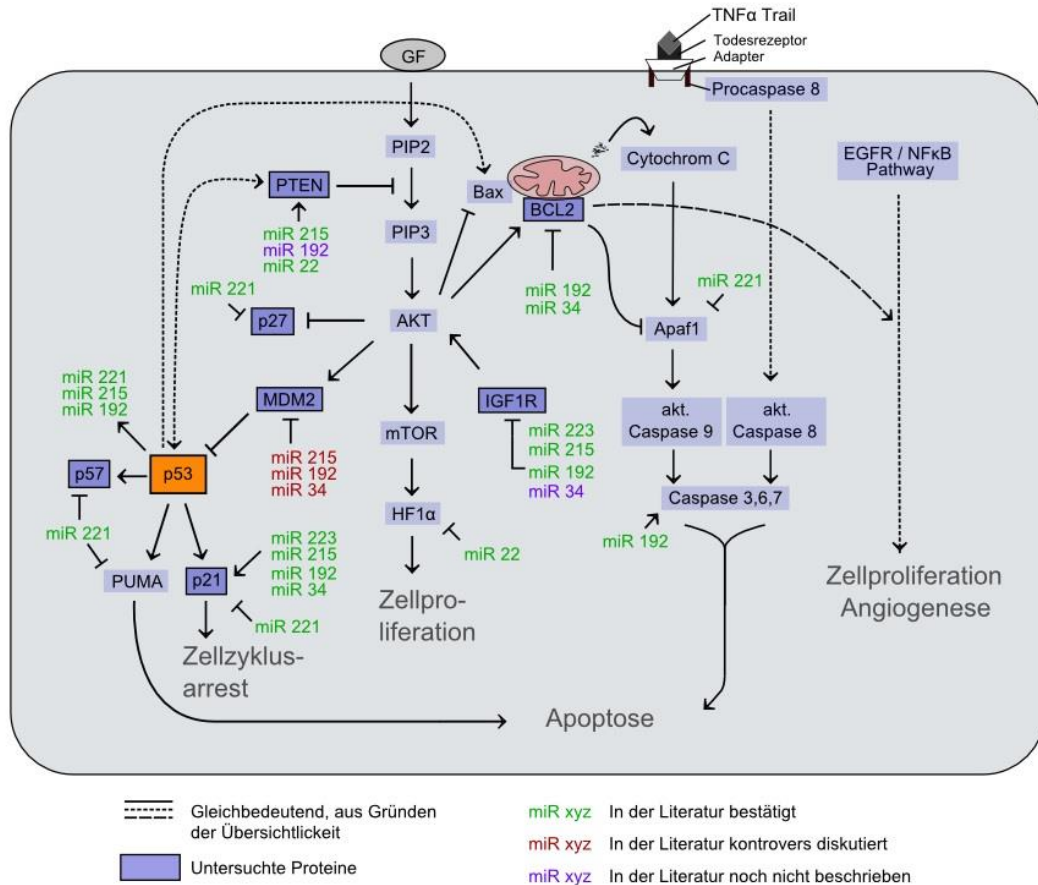


Abbildung 22: p53 Wildtyp- Auswirkungen

Der Fokus liegt dabei auf TP53, welches erwartungsgemäß eine Reihe an miRNAs aber auch mRNAs in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor reguliert. Entsprechend der bisherigen Erläuterungen erfolgte eine Konzentration auf die mRNAs, die als Kontrolleinheiten des Zellzyklus, der Zellproliferation und Apoptose fungieren. Die miRNAs-192, -215, -34 und -223 wurden, wie in der Literatur beschrieben, als Tumorsupressor-miRNA eingestuft, welche den Zellzyklus arretierend also anti-proliferativ wirken. Erwartungsgemäß haben nicht alle miRNAs dieselben Ziele, jedoch ein ähnliches Wirkungsspektrum. So zeigt miRNA-221 onkogene Aktivitäten (OnkomiR), denn sie verhindert sowohl Zellzyklusarrest, als auch Apoptose.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression vieler miRNAs nicht direkt mit dem Mutationszustand des p53-Gen und damit einer Inaktivität des TP53 Proteins gekoppelt ist, sodass bereits auf dem Niveau der Genregulation kein einfacher monokausaler Zusammenhang besteht. Somit muss konsequenterweise ein komplexes Netzwerkes angenommen werden, wodurch es schwierig ist, von einzelnen Ergebnissen aus der Literatur



auf das biologische Verhalten zurückzuschließen. Wenn TP53 regulierte miRNAs trotz Mutation des p53-Gens weiterhin exprimiert werden, so legt dies nahe, dass alternative Regulationsmöglichkeiten vorliegen, die u.U. zum Teil noch unbekannt sind. Somit stellt das Arbeitsmodell (Abb. 22, 23) sicherlich nur einen Bruchteil der „Wahrheit“ dar und müsste erst weiter vervollständigt und um regulatorische Foci ergänzt werden, um die Regulation der miRNAs und die Rolle von TP53 in der Regulation von Proliferation und Apoptose besser und vollständiger zu verstehen. Zudem übernimmt TP53 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation der DNA-Reparatur. Dies ist ebenfalls ein wichtiger Knotenpunkt der Regulation, da durch Chemotherapien DNA-Schädigungen in großem Umfang erzeugt werden. Dieser Aspekt fehlt momentan und sollte in weiterreichende Modellbildungen aufgenommen werden. Insgesamt ist jedoch ersichtlich, dass TP53 auf jeden Fall ein wichtiger Regulator der Zellbiologie ist, auch wenn keine direkte statistische Korrelation zu bestehen scheint.

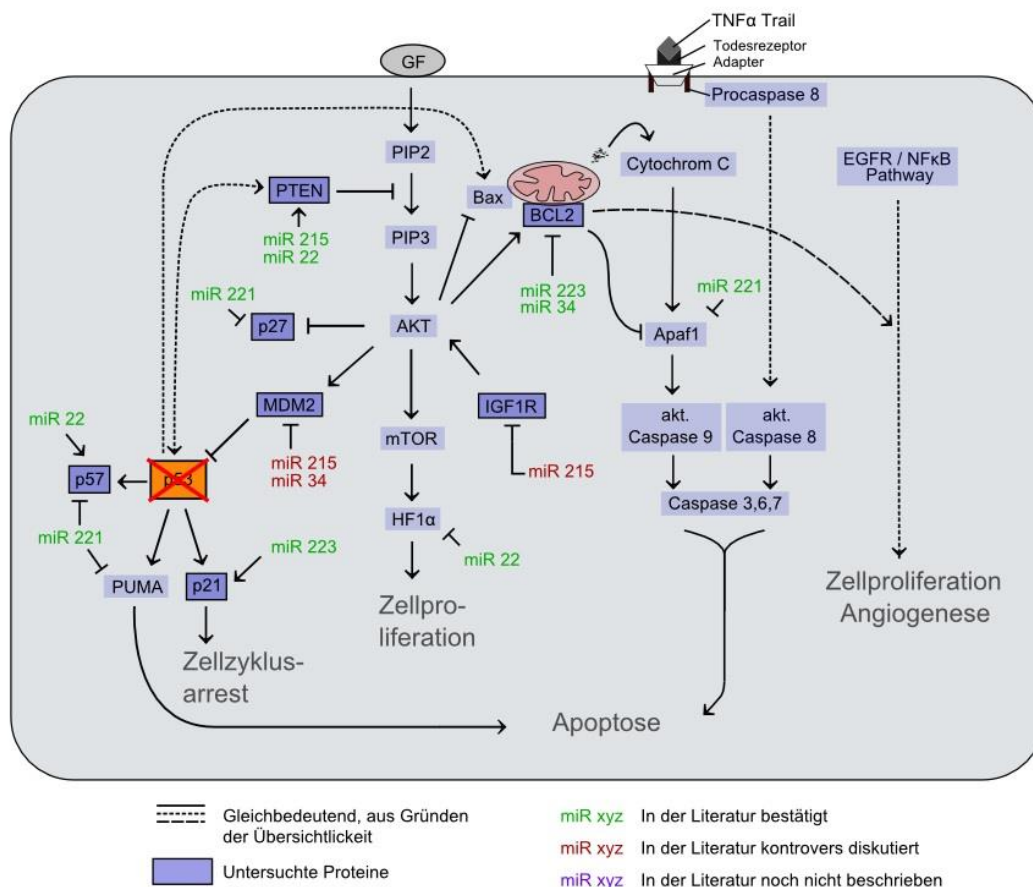


Abbildung 23: p53 Mutation- Auswirkungen

## 6. Starke Tumorsuppressor-miRNA Expression korreliert mit Chemoresistenz

miRNA sind im Vergleich von Tumorgewebe zu Normalgewebe oft unterschiedlich stark exprimiert. Mittels RT-qPCR wurde die Expression der verschiedenen miRNA im Tumor gemessen und mit den Ansprechraten bei späterer Chemotherapie korreliert. Dazu wurden sechs verschiedene miRNA untersucht. Hierbei zeigten miRNA-34, -192, -223 und -215 eine Assoziation und somit potentielle Eigenschaften als Prädiktoren für die Effektivität von Chemotherapie sein zu können. Aufgrund der geringen Fallzahlen und der Tatsache, dass kein weiteres Kollektiv zur Verfügung stand, wurde der Median der Expression als Schwellenwert (*cut off*) angenommen. Die Entscheidung für den Median als Schwellenwert, ermöglichte den Einbezug aller Proben in die Analysen. Da das Studienkollektiv wegen der eingeschränkten Verfügbarkeit von Tumormaterial schon stark limitiert war, konnten dadurch noch kleinere Fallzahlen verhindert werden. Sicherlich muss in Betracht gezogen werden, dass der Median als Schwellenwert die statistische *power* reduziert. Umgekehrt kann man dadurch annehmen, dass Ergebnisse bei statistischer Signifikanz eine noch höhere Aussagekraft bekommen.

Der Verständlichkeit halber wird im weiteren Verlauf die Bezeichnung ‚Ansprechraten‘ mit ORR gleichgesetzt. Damit werden Fälle gruppiert, welche eine Remission des Tumors nach Therapie zeigen. Hohe Ansprechraten sind daher mit Chemosensitivität, niedrige mit Chemoresistenz assoziiert.

Zur Einordnung der Ergebnisse wurde eine statistische Korrelation zwischen miRNA Expression und Effektivität von Chemotherapie hergestellt. Da Chemoresistenz mit einem aktiven Zellzyklus einhergeht, ist zu erwarten, dass OnkomiRs in Zusammenhang mit Chemosensitivität stehen, während Tumorsuppressor miRNAs mit Chemoresistenz einhergehen (Tab. 2). Aufgrund der assoziativen Natur der Ergebnisse können nur Vermutungen über die molekularen Mechanismen angestellt werden. Um diese zu verstehen, wären zum einen breitere und umfangreichere Analysen notwendig, z.B. mittels Nanostring oder RNA-NGS und zum anderen müssten zur genauen Klärung Experimente in Zellkultur durchgeführt werden.

## 6.1 Niedrige miRNA-34 Expression ist mit hohen Effektivitätsparametern bei mIROX Therapie assoziiert

Im mIROX Arm zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Ansprechen der Tumoren mit dem Expressionsniveau von miRNA-34. Die Ansprechraten bei niedriger miRNA-34 Expression waren mit 55,6 % dreimal so hoch wie bei hoher Expression (16,7 %;  $p = 0,034$ ). Bei niedriger miRNA Konzentration waren ferner PFS (niedrig-hoch: 11 Mon.-6 Mon.) und OS fast verdoppelt (14 Mon.-27 Mon.). Somit könnten niedrige miRNA-34 Konzentrationen ein Prädiktor für eine mIROX Therapie sein. Vergleichbare Untersuchungen sind für mIROX Therapie bei KRK unbekannt.

Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang, kann in der Hochregulation der Zellzyklusinhibitors p21 durch miRNA-34 liegen. p21 wurde bereits in zahlreichen Studien mit Chemoresistenz in Verbindung gebracht [89]. Durch die Einleitung des Zellzyklusarrestes befinden sich die Zellen in einem Zustand, welcher sie für Wirkungsweise der Chemotherapeutika, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin, weniger angreifbar macht. Die fehlende Zellteilung verhindert demnach die gewünschte chemotoxische Wirkung. Die Steigung der Ansprechraten bei niedrigen miRNA-34 Werten könnte daher im Umkehrschluss durch die Inhibition einer p21 Hochregulation erklärt werden.

Ein Zusammenhang zwischen miRNA-34 und Ansprechen auf Chemotherapie wird jedoch kontrovers diskutiert [90] [91]. Ein Vergleich dieser Daten mit der hier durchgeführten Studie kann jedoch schwer gezogen werden, weil es sich um andere Tumorentitäten (Glioblastom, Ovarialkarzinom, Endometrium-Karzinom) oder ein anderes Therapieregime (Camptothecin, Cisplatin) handelt [92]. So wurde z.B. bei Prostatakarzinomen eine Assoziation zwischen Chemosensitivität und hohen miRNA-34 Werten unter Camptothecin-Therapie beschrieben[93].

Der FUFIRI-Arm ergab interessanterweise keine prädiktive Relevanz für die Expressionsmenge an miRNA-34. Auch hier finden sich in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen. Für die Einzelsubstanz 5- FU wurde jedoch in Studien ein Zusammenhang zwischen hoher miRNA-34 Expression und Ansprechen auf Chemotherapie gezeigt, indem miRNA-34 transfizierte Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber 5- FU zeigten [94].

Zusammenfassend kann miRNA-34 eine mögliche Rolle in der beobachteten Chemoresistenz bei Oxaliplatin haltiger Chemotherapie zugeschrieben werden.

Dieser Zusammenhang muss in jedem Fall validiert werden und sollte weiterhin auf andere Oxaliplatin haltige Therapieregimes übertragen werden. Ebenfalls bleibt unklar über welchen molekularen Mechanismus miRNA-34 wirkt. Anbieten würden sich hier vor allem Apoptose und Zellzyklus (Proliferation).

## **6.2 Niedrige miRNA-192 Spiegel sind mit deutlich höheren Ansprechraten assoziiert**

Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Effektivität der Chemotherapie und niedrigem miRNA- 192 Expressionsniveau im Tumorgewebe. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Boni und Kollegen unterstützt [80]. Sie zeigten in kultivierten kolorektalen Zelllinien, dass hohe miRNA-192 Spiegel zu erhöhter 5-FU Resistenz führen. Eine Regulation des Zellzyklus wurde als ursächlicher molekularer Mechanismus vorgeschlagen. Denn durch miRNA-192 werden Gene beeinflusst, die die  $G_1 \rightarrow S$  und  $G_2 \rightarrow M$  -*Checkpoints* regulieren. Unter diesen befindet sich u.a. der auch hier untersuchte Zellzyklusinhibitor p21, der auch in dieser Untersuchung erhöhte Expression zeigte (Tab. 14).

## **6.3 Niedrige Mengen an miRNA-215 sind mit guten Ansprechraten bei FUFIRI Therapie assoziiert**

Ein ähnliches Bild ergab sich auch für miRNA-215. Niedrige Expressionsmengen an miRNA-215 im Tumorgewebe korrelierte signifikant ( $p=0,023$ ) mit guten Ansprechen auf FUFIRI (ORR niedrig~hoch: 96,8 % ~ 77,4 %). Für das nicht metastasierte KKR in den Stadien II und III wurde gezeigt, dass miRNA-215 die Proliferationsrate von Zellen reduziert, indem es den Zellzyklus arretiert. Mechanistisch geschieht dies durch eine Reduktion von DTL (*Denticleless E3 Ubiquitin Protein Ligase Homolog*), das Bestandteil des  $G_2 \rightarrow M$  Checkpoints ist [65]. In der Konsequenz kommt es zu einem  $G_2$  Arrest, sodass weniger Zellen in die  $G_1$  und somit S- Phase gelangen können. Weiter ist bekannt, dass DTL in der  $G_1 \rightarrow S$  Phase mit dem Zellzyklusinhibitor p21 interagiert, wodurch es abgebaut wird. Niedrige Mengen an miRNA-215 sollten somit hohe DTL und in der Folge wiederum niedrige Mengen an p21 bedeuten, was gezeigt werden konnte (Tab. 14). Folglich konnten in dieser Arbeit niedrige miRNA-215 Expression mit erhöhtem OS assoziiert werden und hohe miRNA-215

Expression mit schlechteren Effektivitätsparametern, was die Ergebnisse dieser Arbeit weiter unterstützt. Auch Boni et al. untersuchten die Expressionslevel von miRNA-215 in Bezug auf die Chemosensitivität von 5-FU [80]. Analysen an kolorektalen Zelllinien zeigten, dass hohe miRNA-215 Spiegel zu erhöhter Resistenz führen. Dies wurde wie bei miRNA-192 dadurch erklärt, dass miRNA-215 den Zellzyklus arretiert, indem sie Zellzyklus beeinflussende Zielgene im Bereich der  $G_1 \rightarrow S$  und  $G_2 \rightarrow M$ -*Checkpoints* reguliert.

Die zellzyklusinhibitorische- und wachstumshemmende Wirkung von miRNA-215 kann darin bestehen, dass miRNA-215 von TP53 hochreguliert wird, das ebenfalls p21 hochregulieren kann und dadurch folglich zu einem Zellzyklusarrest führt. Zusammen mit der geringeren Menge an DTL führt dies zu einer robusten Expression an p21 (Tab. 14). Weiterhin senkt miRNA-215 IGF1R und erhöht PTEN, was zu einem Proliferationsstop führt. Niedrige miRNA-215 Werte leiten die Zelle demnach in einen stark proliferierenden Zustand und könnten die Zugänglichkeit von Chemotherapeutika erleichtern.

## **7. miRNA beeinflussen Chemoresistenz durch Interaktion mit ihren Zielgenen**

Das Umgehen der Apoptose oder die Induktion eines Proliferationsstopps werden als die beiden Hauptursachen für Chemotherapie Resistenz gesehen[33, 95]. Tumorzellen können der Apoptose entkommen, wenn sie einen Überschuss an anti-apoptotischen Proteinen exprimieren oder Signalwege aktivieren, welche Apoptose hemmen. Auf der anderen Seite kann Chemotherapie nur wirken, wenn Zellen Angriffspunkte für die Chemotherapeutika bieten. Da die Komponenten der Chemotherapie 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin in der  $G_1 \rightarrow S$  und S-Phase wirken, hängt die Wirkung von Chemotherapien mit diesen Komponenten sehr von einem intakten Zellzyklus ab. Da die hier untersuchten miRNAs die Expression von Zellzyklus regulierenden Genen kontrollieren, konnte deren Expression als Plausibilitätskontrolle der Ergebnisse eingesetzt werden (Tab. 14). Speziell zeigten sich signifikante Korrelationen zu den miRNA: BCL2, MDM2, PTEN, p21, p27, IGF1R und p57. Die Rolle dieser Gene wird im weiteren Verlauf diskutiert. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich zum einen lediglich um eine statistische Assoziation handelt, auf der diese Ergebnisse basieren, und zum anderen wurden diese Gene willkürlich aufgrund der Modellbildung selektiert. Dennoch lassen sich aus solchen Zusammenhängen weitere Hypothesen ableiten,

die untersucht werden können und für eine Validierung des Modells wichtig sind, um die Möglichkeit einer Falsifikation zu geben.

### **7.1 Positive Chemotherapie Effekte sind mit dem Zustand einer proliferierenden Zellen mit intaktem Zellzyklus assoziiert**

In der Einleitung stellte sich die Frage, ob Apoptoseinduktion oder der Erhalt des Zellzyklus wichtiger für den Erfolg von Chemotherapie sind. Weiter war die Frage, ob Apoptose von der Funktion von TP53WT abhängig ist. Das Profil der durch die betrachteten miRNAs regulierten mRNAs wies darauf hin, dass der Erhalt des Zellzyklus und somit die Zugänglichkeit von Chemotherapeutika zu ihren Wirkungsorten ein wichtiger Faktor sind. Es wurde gezeigt, dass miRNA-34, -192, -215 und -223 alle zu Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose Genen führen. So reguliert z.B. miRNA-192 Zellzyklusinhibitoren wie p21 und PTEN hoch und Förderer der Proliferation wie IGF1R runter. Diese Konstellation war mit Chemoresistenz korreliert. Umgekehrt zeigten niedrige Spiegel dieser miRNA den Zustand einer hochproliferierenden, nicht arretierten Zelle an und waren erwartungsgemäß mit besseren Ansprechraten verknüpft. Möglicherweise ist also der Erhalt des Zellzyklus grundlegender für das Ansprechen der Therapie.

### **7.2 Zellzyklusinhibitoren sind mit schlechteren Ansprechraten assoziiert**

Wie in der Einleitung besprochen, waren unter den untersuchten Genen die Zellzyklusinhibitoren PTEN, p21, p27 und p57. Die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit ihrer Expression von den hier untersuchten miRNA [61] wurde bestätigt (Tab.14). Gesamtheitlich betrachtet, ließ sich feststellen, dass hohe miRNA Expression und dementsprechend die Hochregulation dieser mRNA mit Chemoresistenz verbunden sind. So wurde zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen hoher miRNA-192 Expression und hohen p21- und PTEN- Werten festgestellt. Diese starke miRNA-192 Expression zeigte jedoch eine Assoziation mit schlechteren Ansprechraten. Dies könnte implizieren, dass ein Proliferationsarrest möglicherweise eine ungünstige Situation für Chemotherapie Effektivität darstellt. Die Korrelation zwischen den jeweiligen Zellzyklusinhibitoren und Chemotherapie Resistenz an sich ergab jedoch keine signifikanten Ergebnisse.

### 7.3 Chemosensitivität durch Proliferationsförderung z.B. mittels IGF1R

Da IGF1R den PI3K/AKT und NF- $\kappa$ B- Signalweg aktiviert, fördert es Zellproliferation und sollte somit ein Indikator für gutes Ansprechen auf Chemotherapie sein. miRNA-34, -192, und -215 reduzierten die Expression des IGF1- Rezeptors signifikant (Tab. 13). Für alle miRNAs ist eine resistenzfördernde Wirkung beschrieben, welche somit durch die Runterregulation von IGF1R erklärbar wäre, wenn man annimmt das die Proliferation der Zelle und somit hohe Zellzyklusraten wichtig für das Ansprechen auf Chemotherapie sind. Zudem wiesen chemoresistente Zellen in den Analysen niedrigere IGF1R Expression auf. So hatten chemosensitive Tumorproben durchschnittlich eine IGF1R- Expression von 22,3 Cp-Einheiten aber chemoresistente Tumoren im Mittel 9,2 Cp-Werte, was in etwa einer 5000-fachen stärkeren Expression entspricht. Die IGF1R Expression hatte jedoch in beiden Fällen keine signifikante Beziehung zum Therapieansprechen. Diese Resultate werden durch die Literatur unterstützt [19, 96]. Durch gerichtete IGF1R Inhibition in Zellkulturuntersuchungen von Dallas et al [19] wurden ein Anstieg der Apoptose und eine Reduktion der Zellzahlen festgestellt. Während die Zellminderung in chemosensitiven Zellen überschaubar war, waren in chemoresistenten Zellen eindrucklich verringerte Zahlen sichtbar. Der Unterschied der Ergebnisse ist möglicherweise das Resultat unterschiedlicher Blickweisen. Während in dieser Arbeit postuliert wird, dass die Ausstattung der prätherapeutischen Tumorzelle mit IGF1R von Vorteil für die Auswirkung einer Chemotherapie ist, wurde in oben genannten Studien in Zellkulturen eine Reduktion von Tumorzellen durch IGF1R- Antagonisierung gezeigt. Daher wurde in diesen Studien kein Zusammenhang auf die Auswirkung einer Chemotherapie untersucht, sondern die Rolle von IGF1R als Angriffspunkt einer Therapie.

## 8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus den bekannten Wegen der intrinsischen und extrinsischen Apoptose und Signalwege wie PI3K, MAPK und NF- $\kappa$ B, welche die Proliferation von Zellen steigern, wurde durch Integration der Ergebnisse ein Modell erarbeitet, das Ansprechen auf Chemotherapie durch miRNA Expression erklären helfen sollte. Da mit Tumormaterial gearbeitet wurde, welches noch keiner Chemotherapie ausgesetzt worden war, kann nur gemutmaßt werden, dass diese molekulare Ausstattung, wie sie analysiert wurde, auch noch nach Exposition von Chemotherapie gültig ist.

Die Wirkung des molekularen Tumorerüsts auf spätere Chemotherapie, lässt also nur die Beschreibung eines Phänomens und die Bildung eines ideellen Modells zu.

Die Schlüsse, die letztendlich aus dieser Arbeit gezogen werden können sind, folgende:

- ❶ Es konnte bestätigt werden, dass es eine Assoziation zwischen p53 Mutation und Änderung der Expression von TP53 regulierten miRNA gibt und dass manche miRNA nur in Anwesenheit von WT p53 exprimiert werden und so an Regulation der Genexpression teilnehmen können.
- ❷ Es wurde gezeigt, dass p53 Mutationen oder eine erhöhte Expression an TP53 an sich keine Funktion als Biomarker für Ansprechen auf Chemotherapie hat, dies jedoch für miRNA-34,-192 und-215 gilt. Dabei stellte sich besonders ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen geringer miRNA-34 Expression und Ansprechen auf Oxaliplatin- haltiger Therapie und ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen miRNA-215 und FUFIRI Therapie dar. Expressionsunterschiede von miRNA-192 hatten keine therapiespezifischen prädiktiven Wert.

## 9. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein deduktives Ableiten eines Modells, das ein komplexes Netzwerk untersuchte, zum Auffinden für Chemotherapie prädiktiver miRNA führt. Der Vorteil dieses Vorgehens ist, dass keine besonders aufwändigen Analysen durchgeführt werden müssen und dieses Vorgehen bereits mit kleineren Fallzahlen zu einem Ergebnis führt. Dieser Erfolg ermutigt nun, komplexere Modelle aufzustellen, in die deutlich mehr miRNAs und mRNAs eingebaut werden sollen. Hierzu bietet sich technisch die Nanostring-Plattform an, die zum einen mit geringen Mengen an RNA auskommt, parallel bis zu etwa 1000 verschiedene Analyten messen kann und sogar in der Lage ist, parallel Proteine zu messen. Auf diese Weise wird es möglich, nicht nur die Expressionsmengen einzelner miRNAs zu bestimmen, sondern auch Zielgene, um so Plausibilitäten zu schaffen. Weiterhin können auf diese Weise auch die Aktivitäten von Signalwegen und *hallmarks of cancer*, wie Proliferation, Apoptose, *cancer stemness* u.a.m. bestimmt werden. So können auf einfache Weise komplexere Zusammenhänge untersucht werden, die weit über Einzelanalysen hinausgehen aber auf der anderen Seite überschaubar bleiben, weil sie nicht unspezifisch arbeiten wie RNA-sequencing Analysen.



Auf einer zweiten Ebene konnten statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen TP53 regulierten miRNAs und Ansprechen auf Chemotherapie geschaffen werden.

Interessanterweise wurden dieser Zusammenhang zwischen ❶ geringer miRNA-34 Expression und Ansprechen auf Oxaliplatin- haltige Therapie, ❷ geringer miRNA- 215 Expression und Ansprechen auf FUFIRI Therapie und ❸ geringer miRNA-192 Expression und Ansprechen auf beide Therapieformen gefunden. Diese Ergebnisse sind natürlich ausgesprochen vorläufig, denn sie müssten in mindestens einem weiteren Kollektiv validiert werden. Um herauszufinden, ob die gefundenen Zusammenhänge auf einzelne Komponenten, z.B. miRNA-34 und Oxaliplatin oder der Kombination aus Oxaliplatin und Irinotecan basieren, müssen verschiedene Kombinationen an Chemotherapeutika untersucht werden. Schließlich bleibt es vollkommen unklar, warum miRNA-192 für beide Arme, FUFIRI und mIROX der FIRE-1 Studie, aber miRNA-34 für die mIROX- und miRNA-215 für die FUFIRI-Kombination prädiktiven Wert haben. Schließlich fehlen dieser Arbeit funktionelle experimentelle Untersuchungen, um einen mechanistischen Zusammenhang und damit Verständnis für die Wirkungsweise der miRNA-34, -192 und -215 zu schaffen.

Wenn sich ein prädiktiver Zusammenhang zwischen den gefundenen miRNA und Ansprechen auf Chemotherapie herstellen ließe, dann stünden damit prädiktive Biomarker zur Verfügung, die aus Tumorproben, Stuhlproben oder liquid biopsies (Blut, Urin, Liquor) gewonnen werden könnten. Dadurch könnte der Nachweis von miRNA ein einfaches und kosteneffektives Instrument darstellen, in der Auswahl spezifischer Therapieregimes bei Patienten mit KKK zu definieren. So wie die schon gängige Bestimmung des RAS- oder BRAF-Mutationsstatus, könnte durch bestimmte miRNA Konstellationen die effektivste und somit erfolgversprechendste Individualtherapie angewandt werden [97] .

## V. Zusammenfassung

Das Fehlen eines Biomarkers für palliative Chemotherapien des metastasierten kolorektalen Karzinom (mKRC) war die Ausgangslage und zugleich Motivation dieser Arbeit. Hieraus ergab sich das Ziel, eine mögliche Strategie zu entwickeln, um prädiktive Biomarker für die Chemotherapie des mKRC aufzufinden. Analog zur anti-EGFR zielgerichteten Antikörpertherapie mit RAS- Mutationsstatus als etabliertem negativ-prädiktivem Biomarker, sollte ein Biomarker für Chemotherapie einen erheblichen Nutzen in der Auswahl der Erstlinien-Chemotherapie haben. Da die richtige Auswahl der Erstlinientherapie der entscheidende Schritt für ein maximales Gesamtüberleben ist, hätten prädiktive Biomarker für die Chemotherapie somit einen hohen therapeutischen Nutzen für Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom.

In einem deduktiven Ansatz wurde daher ein Modell erarbeitet, welches Hinweise auf geeignete Biomarker liefern sollte. Dabei war der Ausgangspunkt der Überlegungen auf das Tumorsuppressorgen p53 gerichtet. Dieses nimmt in der Regulation von Proliferation und Apoptose eine zentrale Rolle ein und ist daher ein interessanter, wegweisender Faktor, um Zusammenhänge mit Chemoresistenz oder –sensitivität für das mKRC zu finden. Die alleinige Betrachtung von p53/ TP53 als Biomarker zeigte bisher jedoch keine oder sehr kontroverse Resultate. Da der Ansatz Gen/ Transkriptionsfaktor/ Zielgen einem linearen (monokausalen) Muster folgt und es nicht anzunehmen ist, dass die Mechanismen, die das Ansprechen auf Chemotherapie bestimmen, einfacher Natur sind, wurde das durch TP53 regulierte Netzwerk betrachtet, weil diese Moleküle die TP53-Achse mit anderen Signalwegen und den *hallmarks of cancer* verbinden. miRNAs interagieren mit einer Vielzahl an mRNAs aus verschiedenen Signalwegen durch komplementäre Bindung an die *target* Sequenz in der 3'UTR (*untranslated region*) der mRNAs, wodurch es in den meisten Fällen zum einem Stopp der Translation und in seltenen Fällen zu einer Degradation der mRNA kommt. Auf diese Weise können schnell komplexere Zusammenhänge geschaffen werden.

Dieser Ansatz wurde in einem Studienkollektiv, der FIRE-1 Studie, anhand von Gewebeblöcken mit FFPE Material geprüft. Die FIRE-1 Studie ist eine klinische randomisierte Phase III Studie, in der die beiden Therapiearme FUFIRI und mIROX gegeneinander getestet wurden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von RT-qPCR die Expression der durch TP53 regulierten miRNAs-22, -34, -192, -215, -221 und -223 und deren

*target* Gene BCL2, MDM2, p21, p27, p57, PTEN und IGF-1R gemessen. Die Messung der Expressionsstärke der Zielgene diente dabei als Indikator bzw. Plausibilitätskontrolle für die Wirkung der miRNA. Es zeigte sich, dass die Expression der miRNA-34, -192 und -215 eine mögliche Funktion als Prädiktionsfaktor einnehmen könnte. Dabei waren niedrige miRNA Werte im Regelfall mit besseren Effektivitätsparametern assoziiert, was nicht verwundert, da die hier gefundenen drei relevanten miRNAs miRNA-34, -192 und -215 alle Tumorsuppressor miRNAs sind. Sowohl ORR als auch PFS und OS steigen bei niedriger miRNA-Expression signifikant an. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass es spezielle miRNA-Therapie Wirkprofile gibt. Niedrige miRNA-34 Expression zeigte einen Zusammenhang mit effektiver miROX Therapie und könnte demnach als ein möglicher Prädiktor für Oxaliplatin-haltige Therapien fungieren. Niedrige miRNA-215 Expression wiederum zeigte eher bei FUFIRI, also 5-FU haltiger Therapie Wirkung. Niedrige miRNA-192 Expression hatte in beiden Therapiearmen signifikanten positiven Einfluss und könnte vor diesem Hintergrund als Indikator für einen erfolgreichereren Verlauf einer Chemotherapie stehen. Obwohl die miRNA teilweise eine signifikante Abhängigkeit vom Mutationszustand des p53-Gens/ TP53 zeigten, stand der p53 Mutationsstatus selbst in keinem Zusammenhang zu den prädiktiven Eigenschaften. Dies unterstützt umso mehr den Gedanken, dass gewählte miRNA nicht nur der Kontrolle von TP53, sondern auch anderer regulatorischen Einheiten bzw. Signalwege unterliegen, die in zukünftige Modelle einbezogen werden sollten. Zusammenfassend wurden mögliche Biomarker gefunden, welche nun in weiteren Studien validiert werden müssen. Durch Erweiterung des p53 Netzwerkes und neuen Erkenntnissen bezüglich Tumorbiologie und Resistenzmechanismen, sollte das exakte Wirken von miRNA weiter verstanden werden. Dieses Wissen könnte in Zukunft in Form von prädiktiven Faktoren oder von miRNA-targeted Therapie eingesetzt werden.

## V. Literaturverzeichnis:

1. <https://www.dkfz.de/de/presse/darmkrebs-zahlen-fakten.html>
2. Gao, P., et al., *Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 123.
3. Pohl, M. and W. Schmiegel, *[Colorectal cancer - personalized, stage-adjusted tumour therapy]*. Dtsch Med Wochenschr, 2013. **138**(36): p. 1790-5.
4. Geng, L., *MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer*. Oncogene, 2013.
5. Modest, D.P., *Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinom*. Der Internist 2014.
6. Wein, A., et al., *Palliative treatment of colorectal cancer with secondary metastasis resection in Germany - impact of the multidisciplinary treatment approach on prognosis and cost: the Northern Bavaria IVOPAK I Project*. Oncology, 2015. **88**(2): p. 103-21.
7. Merck-KGaA, *Erbix (Cetuximab) Fachinformation*, in Rote Liste Fachinfo-Service. August 2009.
8. Pox, C.P. and W. Schmiegel, *[German S3-guideline colorectal carcinoma]*. Dtsch Med Wochenschr, 2013. **138**(49): p. 2545.
9. Eric Van Cutsem, H.-J.L., Claus-Henning Köhne, Volker Heinemann, Sabine Tejpar, Ivan Melezínek, Frank Beier, Christopher Stroh, Philippe Rougier, J. Han van Krieken, and Fortunato Ciardiello, *Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2015.
10. C.F. et. al, [http://www.gi-oncology.de/download/2014/Vortraege/Heinemann-%20Stratifizierte%20Therapie-4\\_Heinemann.pdf](http://www.gi-oncology.de/download/2014/Vortraege/Heinemann-%20Stratifizierte%20Therapie-4_Heinemann.pdf).
11. Douillard, J.Y., et al., *Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2014. **25**(7): p. 1346-55.
12. Maughan, T.S., et al., *Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial*. Lancet, 2011. **377**(9783): p. 2103-14.
13. Saltz, L.B., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 2013-9.
14. Peeters, M., et al., *Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(31): p. 4706-13.
15. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
16. Bokemeyer, C., et al., *Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study*. Ann Oncol, 2011. **22**(7): p. 1535-46.
17. Giantonio, B.J., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200*. J Clin Oncol, 2007. **25**(12): p. 1539-44.
18. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1626-34.
19. Dallas, N.A., et al., *Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 1951-7.
20. Folprecht, G., et al., *Dose escalating study of cetuximab and 5-FU/folinic acid (FA)/oxaliplatin/irinotecan (FOLFOXIRI) in first line therapy of patients with metastatic colorectal cancer*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 521.

21. Venook, A.P., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of irinotecan in patients with hepatic or renal dysfunction or with prior pelvic radiation: CALGB 9863*. Ann Oncol, 2003. **14**(12): p. 1783-90.
22. Cremolini, C., et al., *FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(13): p. 1306-15.
23. [https://www.dr.falkpharma.de/uploads/tx\\_tocme2/FGK\\_3\\_13\\_Harder\\_Geissler.pdf](https://www.dr.falkpharma.de/uploads/tx_tocme2/FGK_3_13_Harder_Geissler.pdf), I.
24. Thirion, P., et al., *Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis*. J Clin Oncol, 2004. **22**(18): p. 3766-75.
25. Köhne, c., *Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinom mit 5-FU/ Folinsäure und Irinotecan*. Deutsches Ärzteblatt, 2002.
26. Köhne, P.-D.D.m.h.C.-H., *Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinom mit 5-FU/Folinsäure und Irinotecan*. Ärzteblatt 5/2002.
27. Bosch, T.M., et al., *Rapid detection of the DPYD IVS14+1G>A mutation for screening patients to prevent fluorouracil-related toxicity*. Mol Diagn Ther, 2007. **11**(2): p. 105-8.
28. <http://www.darmkrebs.de/behandlung/chemotherapie/krebsmedikamente-%28zytostatika%29/>, I.
29. Graeven, P.D.U., <http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/krebs/kolorektales-karzinom/article/329637/lebensverlaengernde-neue-strategien-ergaenzen-standard-chemotherapie.html>. 2004
30. Liu, X., et al., *Association of UGT1A1[ast]28 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians*. Pharmacogenomics J, 2014. **14**(2): p. 120-129.
31. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell. **144**(5): p. 646-674.
32. Daniela Kandioler-Eckersberger, S.K., *P53 – vom prognostischen zum prädiktiven Marker*. Research Gate.
33. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-323.
34. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from Hereditary Colorectal Cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-170.
35. A, L., [<pdf prädiktive faktoren.pdf>](#).
36. Fearon, E., *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990.
37. Pantziarka, P., *Primed for cancer: Li Fraumeni Syndrome and the pre-cancerous niche*. Ecancermedalscience, 2015. **9**: p. 541.
38. Donehower, L.A., et al., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
39. He, L., *MicroRNAs join the p53 network — another piece in the tumour-suppression puzzle*. Rev Cancer, 2007.
40. Lopez, I., et al., *Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer*. Gene, 2012. **499**(1): p. 81-7.
41. Guo, X.-l., et al., *Inhibition of p53 increases chemosensitivity to 5-FU in nutrient-deprived hepatocarcinoma cells by suppressing autophagy*. Cancer Letters, 2014. **346**(2): p. 278-284.
42. Hwang, C.I., et al., *Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14240-5.
43. Bleeker, W.A., et al., *Prognostic significance of K-ras and TP53 mutations in the role of adjuvant chemotherapy on survival in patients with Dukes C colon cancer*. Dis Colon Rectum, 2001. **44**(3): p. 358-63.
44. Daniel, D.m.P., *Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren*.

45. Biegging, K.T., S.S. Mello, and L.D. Attardi, *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(5): p. 359-370.
46. Kodach, L.L., et al., *Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells*. Carcinogenesis, 2006. **27**(3): p. 508-16.
47. Hengst, P.D.L., *Das p27-Protein ist mehr als eine Bremse des Zellzyklus* Lab & more, 2009.
48. Hsu, C.P., et al., *Clinical significance of tumor suppressor PTEN in colorectal carcinoma*. Eur J Surg Oncol, 2011. **37**(2): p. 140-7.
49. Karl, E., et al., *Bcl-2 acts in a proangiogenic signaling pathway through nuclear factor-kappaB and CXC chemokines*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5063-9.
50. Pietenpol, J.A., et al., *Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 1998-2002.
51. Xi, Y., et al., *Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2014-24.
52. Kent, O.A., *A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes*. Oncogene, 2006.
53. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
54. D., B., *MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions*. Cell, 2009.
55. Song, B., et al., *miR-192 Regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(24): p. 8080-6.
56. Mavrakis, K.J., C.S. Leslie, and H.G. Wendel, *Cooperative control of tumor suppressor genes by a network of oncogenic microRNAs*. Cell Cycle, 2011. **10**(17): p. 2845-9.
57. Costa, P.M. and M.C. Pedroso de Lima, *MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(10): p. 1195-220.
58. Suzuki, H.I. and K. Miyazono, *Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(11): p. 1085-94.
59. Roy, S., et al., *Expression of miR-34 is lost in colon cancer which can be re-expressed by a novel agent CDF*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 58.
60. Tsuchiya, N., et al., *Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21*. Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4628-39.
61. Braun, C.J., et al., *p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10094-104.
62. Zhao, G., et al., *MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53906.
63. Wei, Y., et al., *Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2014.
64. Galardi, S., et al., *miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23716-24.
65. Karaayvaz, M., et al., *Prognostic significance of miR-215 in colon cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2011. **10**(4): p. 340-7.
66. Yamakuchi, M., et al., *MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20291.
67. Zeindl-Eberhart, E., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition Induces Endoplasmic-Reticulum-Stress Response in Human Colorectal Tumor Cells*. PLoS ONE, 2014. **9**(1): p. e87386.
68. Zhang, G., et al., *Clinical significance of miR-22 expression in patients with colorectal cancer*. Med Oncol, 2012. **29**(5): p. 3108-12.
69. Zhang, J., et al., *MicroRNA-223 functions as an oncogene in human colorectal cancer cells*. Oncol Rep, 2014. **32**(1): p. 115-20.

70. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
71. Sun, D., et al., *C/EBP-beta-activated microRNA-223 promotes tumour growth through targeting RASA1 in human colorectal cancer*. Br J Cancer, 2015. **112**(9): p. 1491-500.
72. Wu, L., et al., *MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation*. FEBS Lett, 2012. **586**(7): p. 1038-43.
73. Siemens, H., et al., *Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness*. Oncotarget, 2013. **4**(9): p. 1399-415.
74. Zhao, J., et al., *TP53-independent function of miR-34a via HDAC1 and p21(CIP1/WAF1.)*. Mol Ther, 2013. **21**(9): p. 1678-86.
75. Bommer, G.T., et al., *p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes*. Curr Biol, 2007. **17**(15): p. 1298-307.
76. Misso, G., et al., *Mir-34: A New Weapon Against Cancer?* Mol Ther Nucleic Acids, 2014. **3**: p. e194.
77. Hermeking, H., *The miR-34 family in cancer and apoptosis*. Cell Death Differ, 2010. **17**(2): p. 193-9.
78. Hermeking, H., *MiR-34a and p53*. Cell Cycle, 2009. **8**(9): p. 1308.
79. Svoboda, M., et al., *MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients*. Radiat Oncol, 2012. **7**: p. 195.
80. Boni, V., et al., *miR-192/miR-215 Influence 5-Fluorouracil Resistance through Cell Cycle-Mediated Mechanisms Complementary to Its Post-transcriptional Thymidilate Synthase Regulation*. Molecular Cancer Therapeutics, 2010. **9**(8): p. 2265-2275.
81. Fischer von Weikersthal, L., et al., *Phase III trial of irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/folinic acid versus irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment of advanced colorectal cancer*. Eur J Cancer, 2011. **47**(2): p. 206-14.
82. Giessen, C., et al., *Evaluation of prognostic factors in liver-limited metastatic colorectal cancer: a preplanned analysis of the FIRE-1 trial*. Br J Cancer, 2013. **109**(6): p. 1428-1436.
83. Brooks, C.L. and W. Gu, *Dynamics in the p53-Mdm2 ubiquitination pathway*. Cell Cycle, 2004. **3**(7): p. 895-9.
84. ThermoFisher, *Nano Drop 260/ 280 Analyse*. PDF.
85. Exiqon, *<Universal-RT-microRNA-PCR-manual.pdf>*.
86. Soong, R., et al., *Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas*. Human Pathology. **27**(10): p. 1050-1055.
87. Veloso, M., et al., *p53 Gene status and expression of p53, mdm2, and p21Waf1/Cip1 proteins in colorectal cancer*. Virchows Archiv, 2000. **437**(3): p. 241-247.
88. Masciarelli, S., et al., *Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells*. Oncogene, 2014. **33**(12): p. 1601-8.
89. Rau, B., et al., *Dynamic Expression Profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 Predicts Survival in Rectal Carcinoma Treated With Preoperative Radiochemotherapy*. Journal of Clinical Oncology, 2003. **21**(18): p. 3391-3401.
90. Li, Y., et al., *MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7569-76.
91. Notaro, S., et al., *Die Rolle der mir-34 Familie beim Typ I und Typ II Ovarialkarzinom*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2016. **76**(03): p. A18.
92. Jiang, L., et al., *MiR-34c oligonucleotide enhances chemosensitivity of Ishikawa cell to cisplatin by inducing apoptosis*. Cell Biology International, 2013. **37**(6): p. 577-583.
93. Fujita, Y., et al., *Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **377**(1): p. 114-119.
94. Kähler, C., *Die Rolle zellulärer Stressantworten bei der Chemoresistenz gegenüber 5-Fluorurazil*. Dissertation.
95. Hermeking, H., et al., *Abrogation of p53-induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an inhibitor of p21WAF1/CIP1/SDI1*. Oncogene, 1995. **11**(7): p. 1409-15.

96. Leiphrakpam, P.D., et al., *In vivo analysis of insulin-like growth factor type 1 receptor humanized monoclonal antibody MK-0646 and small molecule kinase inhibitor OSI-906 in colorectal cancer*. *Oncology Reports*, 2014. **31**(1): p. 87-94.
97. VALERI, N., C.M. CROCE, and M. FABBRI, *Pathogenetic and Clinical Relevance of MicroRNAs in Colorectal Cancer*. *Cancer Genomics - Proteomics*, 2009. **6**(4): p. 195-204.

## VI. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: 5-Jahres Überleben in Abhängigkeit des Tumorstadiums nach UICC Klassifikation ([4] ....	2
Abbildung 2: Ergebnisse der CRYSTAL Studie von Ciardiello F et. al. [10] .....	5
Abbildung 3: 5-FU ( $C_4H_3FN_2O_2$ ) und Folinsäure ( $C_{20}H_{23}N_7O_7$ ) .....	8
Abbildung 4: Oxaliplatin-Strukturformel .....	10
Abbildung 5: Irinotecan Strukturformel .....	10
Abbildung 6: Adenom-Karzinom Sequenz nach dem Vogelstein- Modell [36] .....	13
Abbildung 7: Regulation und Wirkmechanismus von TP53 .....	15
Abbildung 8: Angriffspunkte der Zytostatika im Zellzyklus und der Einfluss von p53 .....	17
Abbildung 9: Möglicher Erwerb von Chemoresistenz von 5- FU bei p53 WT .....	17
Abbildung 10: TP53 reguliert Zellproliferation, -arrest und Apoptose durch die transkriptionelle Regulation und Interaktion einer Vielzahl von Faktoren. ....	19
Abbildung 11: TP53 reguliertes Netzwerk (Abb. 10) um miRNA erweitert .....	21
Abbildung 12: Zwei Mechanismen der negativen Regulierung durch miRNA. ....	22
Abbildung 13: miRNA 221 Bindung im 3'UTR von PTEN. Die target sequence, über die miRNA 221 und PTEN aneinander binden, ist in rot dargestellt. ....	23
Abbildung 14: Tumorsupressorwirkung von miRNA (A) und die Auswirkung von Dysfunktionen (B)..	25
Abbildung 15: Die Wirkung von p53 je nach genotoxischem Stress[36] .....	28
Abbildung 16: Die stabilisierende Wirkung von miRNA 34 auf p53 .....	29
Abbildung 17: Arbeitsplan .....	31
Abbildung 18: Kohortendiagramm der Studie .....	32
Abbildung 19: Beispiele für Negativität (links) und Positivität (rechts) des immunhistochemischen TP53 Nachweises .....	38
Abbildung 20: Temperaturoptimierung. ....	41
Abbildung 21: qPCR für MDM2 mit verschiedenen Kombinationen an Primerkonzentrationen. ....	43
Abbildung 22: p53 Wildtyp- Auswirkungen .....	66
Abbildung 23: p53 Mutation- Auswirkungen .....	67

## VII. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Ansprechraten und PFS je nach Therapielinie .....	6
Tabelle 2: TP53 regulierte miRNA, die in der Regulation des Zellzyklus involviert sind. ....	25



Tabelle 3: Therapieprotokoll FUFURI (Referenzarm). .....	33
Tabelle 4: Therapieprotokoll mIROX (experimenteller Arm .....	33
Tabelle 5: Klinisch- pathologische Charakterisierung des Teilkollektivs der FIRE-1 Studie, die in die vorliegende Untersuchung einbezogen wurde. ....	34
Tabelle 6: Arbeitsplan.....	34
Tabelle 7: Pipettieransatz PCR.....	40
Tabelle 8: Verschieden Kombinationen von Primer Konzentrationen.....	42
Tabelle 9: Absorptionsquotienten der gewonnenen RNA Isolate. OD, optische Dichte.....	43
Tabelle 10: Darstellung des Ansprechens in den jeweiligen Therapiearmen, mit Vergleich zu den Originaldaten der FIRE1 Studie[80] .....	49
Tabelle 11: IHC- NGS Kreuztabelle. Positiv prädiktiver Wert der IHC-Analyse: 90%. Negativ prädiktiver Wert der IHC- Analyse: 71% .....	51
Tabelle 12: Charakterisierung der eingesetzten Primer für qPCR.....	52
Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten miRNA .....	53
Tabelle 14: Signifikante miRNA- Gen Wechselbeziehungen .....	54
Tabelle 15: Einfluss von p53 auf ORR, PFS und OS.....	56
Tabelle 16: Effektivitätsparameter bei FUFIRI oder mIROX Therapie in Abhängigkeit der miRNA Konzentration. ....	57

## VIII. Diagrammverzeichnis:

Diagramm 1: Ansprechraten des Patienten des eingesetzten Teilkollektivs der FIRE-1Studie. ....	50
Diagramm 2: miRNA-192 und -221 Expression in Abhängigkeit von p53 .....	53
Diagramm 3: Die Expressionsstärken einiger TP53 regulierter miRNA korrelieren mit dem Ansprechen (ORR, overall response rate) auf Chemotherapie. ....	58
Diagramm 4: Gesamtüberleben (OS, overall survival) bei FUFIRI oder mIROX Therapie in Abhängigkeit der miRNA Expressionsstärke.....	59
Diagramm 5: Progressionsfreies Überleben (PFS, progression free survival) bei FUFIRI oder mIROX Therapie in Abhängigkeit der miRNA Expressionsstärke. ....	59

## **Danksagung**

Zuallererst will ich Prof. Dr. Thomas Kirchner meinen Dank aussprechen, der mir die Möglichkeit der Promotion am Pathologischen Institut der LMU überhaupt erst ermöglicht hat.

Ich bedanke mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Professor Andreas Jung für seine Unterstützung, seine Geduld, die vielen guten Anregungen und dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Weiter danke ich PD Dr. Sebastian Stintzing für sein positives Feedback und viele motivierende Worte.

Besonders danke ich meinem Laborteam! Ohne Sabine Sagebiel- Kohler, Gertrud Lenz, Stefanie Jaitner und Sabine Jung wäre die Zeit im Labor nicht so erfolgreich und kurzlebig gewesen. Ob beim Erlernen neuer Methoden, beim Mitfiebern bei den RT- PCRs oder bei problemorientierter Lösungssuche, hat es nie an Unterstützung gefehlt.

Auch PD Dr. Dr. Jens Neumann, danke ich recht herzlich für die Schulung im Auswerten immunhistochemisch gefärbter Tumorschnitte.

Herrn Sebastian Schaaf danke ich sehr für die zeitnahe Bereitstellung der NGS Daten.

Zuletzt natürlich noch ein großer Dank an all die tollen Menschen um mich herum, die mit mir mitgefiebert, meine Ausführungen kritisch hinterfragt, mich allzeit unterstützt und wenn nötig auch wieder motiviert haben.

### **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Heinemann Giovanna, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 12.07.2016

Giovanna Heinemann